

**N° d'ordre : 2548**

# **THÈSE**

Présentée

Pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**École doctorale : Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries**

**Spécialité : Ecologie et Agrosystèmes**

Par

**Houda EL HAJJOUJI**

**Evolution des caractéristiques physico-chimiques,  
spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries  
d'olive au cours de traitements biologique et chimique**

Soutenue le 24 novembre 2007, devant le jury composé de :

|    |                    |                                   |                    |
|----|--------------------|-----------------------------------|--------------------|
| M. | Ali BOUMEZZOUGH    | Professeur, FSS Marrakech         | Président          |
| M. | Mohamed HAFIDI,    | Professeur, FSS Marrakech         | Directeur de thèse |
| M. | Jean-Claude REVEL  | Professeur, INP Toulouse          | Directeur de thèse |
| M. | André AMBLES       | Professeur, Université de Poitier | Rapporteur         |
| M. | Salah SOUABI       | Professeur, FST Mohamedia         | Rapporteur         |
| M. | Eric PINELLI       | Professeur, INP Toulouse          | Membre             |
| M. | Abdelrani YAACOUBI | Professeur, FSS Marrakech         | Membre             |

# Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique

## Résumé

Le premier volet de ce travail consiste à suivre les transformations des effluents d'huileries d'olives traités par un procédé biologique et chimique, en utilisant les différents paramètres physico-chimiques (pH, rapport C/N, phénols totaux, demande chimique en oxygènes (DCO), lipides) et spectroscopiques (UV-visible, IRTF,  $^{13}\text{C}$ -RMN).

Les résultats du traitement biologique ont permis la mise en évidence des conditions optimales de traitement de ces effluents. Après 45 jours, les traitements ont permis la réduction de la pollution de ces effluents avec des abattements en DCO de 21.8% et 4.8% respectivement pour les traitements sans et avec chaux. La neutralisation du pH par ajout de chaux a montré un abattement de 75.9% en termes de phénols totaux. La spectroscopie IRTF et  $^{13}\text{C}$ -RMN ont montré qu'au cours du traitement avec chaux, les groupements aliphatiques diminuent et les structures aromatiques augmentent, ce qui indique la polymérisation de la matière organique. Le suivi de la fraction lipidique montre des variations pour les lipides totaux et pour les fractions lipidiques (lipides neutres, monoglycérides et phospholipides) en fonction du traitement choisi (sans ou avec chaux). Les lipides totaux augmentent pour le traitement sans chaux et diminuent pour le traitement avec chaux, correspondant à la variation des phospholipides. La spectroscopie  $^{13}\text{C}$ -RMN a confirmé ces variations et elle a montré la similitude entre le traitement des effluents à la chaux et le traitement au solvant (chloroforme/méthanol). Elle a aussi mis en évidence deux zones spectrales intéressantes C O-alkyle (50 -110 ppm) et C-carboxylique (160-200 ppm).

Les résultats du traitement chimique sous UV/ $\text{TiO}_2$  ont montré une réduction du pouvoir polluant des effluents d'huileries d'olive. Les abattements après 24 heures de traitement sont de 22.2%, 57% et 94.3% respectivement pour la DCO, la coloration (UV à 330 nm) et les phénols totaux. La spectroscopie UV-visible et IRTF ont montré qu'il y a une attaque prioritaire des parties aromatiques et elle fait apparaître dans le processus de dégradation l'existence de trois phases successives qui peuvent correspondre à trois types différents de molécules dans les effluents d'huileries d'olive.

Le deuxième volet de ce travail est consacré à l'étude de la toxicité et de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive après traitement biologique sur les plants de *Vicia faba* à l'aide du test des micronoyaux et d'un essai agronomique. Les résultats du test des micronoyaux ont montré que les effluents non traités sont génotoxiques à une concentration de 10%. Cette génotoxicité est liée à la présence de deux composés phénoliques : l'oleuropeine et l'acide gallique. Après traitement biologique, la génotoxicité de ces effluents a disparu même à une concentration de 20%. Ceci peut être expliqué par l'abattement important des phénols totaux au cours du traitement (75.9%). Le test agronomique a montré l'absence de toxicité des effluents traités par procédé biologique sur *Vicia faba*. En effet, les doses 5 t/ha et 10 t/ha ont donné des rendements respectivement supérieurs de 36.3% et de 29.9% par rapport au témoin.

Les effluents d'huileries d'olive traités par un procédé biologique ne présentent alors aucun risque de toxicité ni de génotoxicité sur les plants de *Vicia faba*, ils peuvent alors être utilisé, sans risque, comme amendement organique sur les sols marocains.

**Mots clés :** Effluents d'huileries d'olives, traitement biologique, traitement chimique, spectroscopie, *Vicia faba*, test des micronoyaux, essai agronomique.

# Evolution of the physico-chemical, spectroscopic and ecotoxicological characteristics of olive mill waste water during biological and chemical treatments

## Abstract

The first part of this work concerns the monitoring of treated olive mill waste water (OMWW) transformations during biological and chemical processes : different physico-chemical parameters (pH, C/N ratio, chemical oxygen demand (COD), level of total phenols and lipids) and spectroscopic analysis (UV-Visible, IRTF,  $^{13}\text{C}$ -NMR).

The results of the biological treatment permitted us to determine the optimal conditions of OMWW treatment. After 45 days, the treatment decreased the COD, particularly for treatments without lime with a drop of 21.8% while the COD drop in treatments with lime only reached 4.8%. Neutralising the pH by the addition of lime had a positive effect on the degradation of total phenols, lowering their levels by 75.9%. The results of FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy showed that during treatment with lime, the aliphatic groups decreased and the aromatic structures increased, indicating polymerisation of the organic matter. The lipid content showed an appreciable change in the relation to the applied treatment both for total lipids and for the lipidic fractions (neutral lipids, monoglycerides and phospholipids). Total lipid increased for treatment without lime and decreased for treatment with lime, corresponding to the variation in the level of phospholipids.  $^{13}\text{C}$ -NMR confirmed these variations and showed the likeness between the treatment of the OMWW with lime and the treatment with solvent (chloroform/methanol). The main spectral differences were observed in the C O-Alkyl region (50 -110 ppm) and in the C-carboxylic region (160-200 ppm).

The results of the chemical treatment using  $\text{TiO}_2$  under UV showed depollution of the OMWW. Over 24 hours, the treatment degraded 22.2% of the pollutant COD, 57% of the coloured molecules (UV to 330 nm) and 94.3% of the total phenols. The UV-Visible and FTIR spectroscopy showed extensive attack of the aromatic structures and revealed the occurrence of three successive phases during the degradation process, thought to correspond to three different categories of molecules in the OMWW.

The second part of this work concerns the study of the toxicity and the genotoxicity of OMWW after biological treatment, on *Vicia faba* plants, by micronucleus and agronomic tests. The results of the micronucleus test showed that raw OMWW was genotoxic at a 10% OMWW concentration. This genotoxicity was associated to two phenolic compounds: gallic acid and oleuropein. After biological treatment, the genotoxicity disappeared at a 20% OMWW concentration. This can be explained by the extensive degradation of phenols during the treatment (75.9%). The agronomic test showed the absence of toxicity of treated OMWW on *Vicia faba* plants. Indeed, at doses of 5 t/ha and 10 t/ha outputs were 36.3% and 29.9% greater than the negative control respectively.

OMWW treated by a biological process do not present any risk of toxicity or genotoxicity on *Vicia faba* plants, the treated effluent can be used, without risk, as organic amendment on Moroccan soils.

**Keywords:** Olive mill waste water, biological treatment, chemical treatment, spectroscopy, *Vicia faba*, micronucleus test, agronomic test.

## تطور الخصائص الفيزيوكيميائية، الطيفية والسامة للنفايات السائلة لمعاصر الزيتون خلال المعالجة البيولوجية والكيميائية

### ملخص

يتطرق الجزء الأول من هذا البحث إلى دراسة تطور النفايات السائلة لمعاصر الزيتون أثناء معالجتها بطريقة بيولوجية وكيميائية، باستعمال الثوابت الفيزيوكيميائية (درجة الحموضة (pH)، النسبة C/N، المستوى الإجمالي للفنول، الطلب الكيميائي على الأكسجين (DCO)، الدهون) والتحليل الطيفي (الأشعة فوق البنفسجية المرئية (UV-Visible)، الفحص المباشر بالأشعة تحت الحمراء (IRTF) والرنين المغناطيسي النووي للكربون 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN)).

مكنت عملية المعالجة البيولوجية من تحديد الظروف المثلى لمعالجة النفايات السائلة لمعاصر الزيتون ومكنت كذلك، بعد 45 يوما، من تخفيض نسبة التلوث الذي تحدثه هذه النفايات. حيث بلغت نسبة الانخفاض في الطلب الكيميائي على الأكسجين 21,8% بالنسبة للمعالجة دون الجير و 4,8% بالنسبة للمعالجة بالجير، كما أن الرفع من درجة حموضة هذه النفايات (بإضافة الجير) كان له انعكاس إيجابي على تخفيض نسبة الفينول ب 75,9%. كما أظهرت نتائج التحليل الطيفي (IRTF و  $^{13}\text{C}$ -RMN) أنه خلال المعالجة بالجير، انخفضت نسبة المركبات الألفاتيكية وارتفعت نسبة المركبات الأروماتيكية مشيرة بذلك إلى عملية بلمرة المادة العضوية.

أظهرت دراسة الدهون تغييرا ملحوظا في المستوى الإجمالي للدهون وفي نسب phospholipides و monoglycérides و lipides neutres. أكد الرنين المغناطيسي النووي للكربون 13 التغييرات السابق ذكرها وبين التشابه بين المعالجة بالجير والمعالجة بالمحلات (كلوروفورم / ميثانول). كما مكن من إظهار منطقتين طيفيتين C O-alkyle (50-110ppm) و C-carboxylique (160-200ppm).

أظهرت نتائج العلاج الكيميائي باستعمال  $\text{TiO}_2$  والأشعة فوق البنفسجية (UV-Visible)، لمدة 24 ساعة، انخفاضا في نسبة التلوث الذي تحدثه هذه النفايات (22,2% بالنسبة للطلب الكيميائي على الأكسجين، 57% بالنسبة للتلوين (UV à 300nm) و 94,3% في النسبة الإجمالية للفينول). كما أثبتت نتائج التحليل الطيفي (UV-Visible و IRTF) انخفاضا في المركبات الأروماتيكية وأظهرت ثلاثة مراحل متتالية توافق ثلاث فئات مختلفة من الجزيئات.

أما الجزء الثاني من هذا البحث فقد تطرق إلى دراسة السامة والجينية للنفايات السائلة المعالجة على نبات الفول بواسطة تجربة النويات والتجربة الزراعية. أظهرت نتائج تجربة النويات أن النفايات الغير المعالجة والمخفضة إلى 10% تحدث سمية جينية على نبات الفول بسبب احتوائها على مركبين فينولين: acide gallique و oleuropeine، على عكس ذلك، فالنفايات المعالجة المخففة إلى 20% لا تحدث أي سمية عند نفس النبات. ويرجع ذلك إلى الانخفاض الهام في نسبة الفينول بعد المعالجة (75,9%). كما أكدت التجربة الزراعية غياب السمية عند نبات الفول بعد المعالجة، حيث أن الجرعتين 5t/ha و 10t/ha أعطيتا مردودية تتعدى الشاهد بنسبة 36,3% و 29,9% على التوالي.

يمكن إذن القول أن النفايات السائلة لمعاصر الزيتون المعالجة بطريقة بيولوجية لا تشكل أي خطر سامة على نبات الفول. يمكن إذن استعمالها كسماد عضوي لتحسين مردودية الإنتاج.

**الكلمات المفتاحية:** النفايات السائلة لمعاصر الزيتون، المعالجة البيولوجية، المعالجة الكيميائية، الفول، تجربة النويات، التجربة الزراعية.

## REMERCIEMENTS

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thématique de recherche développée, au sein du laboratoire «Equipe Ecologie Végétale, Sol et Environnement» à la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech, sur le traitement des déchets d'huileries d'olive et sur le suivi de l'évolution et des transformations de ces déchets au cours des traitements aérobies.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de thèse, m'ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à Mr Mohamed HAFIDI, mon Directeur de thèse et Professeur à la Faculté des Sciences Semlalia, pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant ce thème de recherche. Ses critiques constructives et sa rigueur scientifique m'ont été très utiles pour mener à bien ce travail. Je le remercie également pour son encouragement à la participation à de nombreuses manifestations internationales et nationales qui m'ont beaucoup enrichie. Alors, au moment où s'achève ce travail, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma très grande reconnaissance.

Mes profonds remerciements vont également à mon co-encadrant le Professeur Jean-Claude REVEL de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT), qui m'a acceptée dans son laboratoire et m'a intégrée au sein de son équipe. Ses conseils avisés m'ont été précieux pour la rédaction du présent manuscrit. Je le remercie également pour son soutien matériel qui m'a permis de réaliser les différentes analyses physico-chimiques et spectroscopiques de mes échantillons et m'a permis d'assister aux manifestations scientifiques internationales.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à Mr Jean-Renné BAILLY, Professeur à l'Université de Perpignan, pour son aide, sa patience, sa disponibilité et pour ses conseils théoriques et pratiques qui m'ont beaucoup aidée à réaliser ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour le soutien continu et sans faille qu'il n'a cessé de m'apporter durant toute ma période de stage.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Mr Eric PINELLI, Professeur à l'ENSAT. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance pour tout le temps qu'il m'a consacré et pour l'aide qu'il m'a apportée pour réaliser ce travail. Je le remercie aussi de tout mon cœur pour la sympathie qu'il a toujours manifestée à mon égard.

Je remercie également Mr Georges MERLINA, Ingénieur de recherche - HDR à l'ENSAT, pour le temps qu'il m'a consacrée malgré ses nombreuses occupations. Ses précieux avis et conseils m'ont été d'une grande utilité. Je le remercie également pour son aide dans les analyses d'une partie de mes échantillons.

Je remercie également les Professeurs Abdelrani YAACOUBI et Hassan HAMDI, de la Faculté des Sciences Semlalia, pour leur aide et leurs conseils scientifiques.

J'adresse un remerciement particulier à Mme Claire RICHARD de l'Université Blaise Pascal, à Mr Jérôme SYLVESTRE, Mr Michael KAEMMERER et Mme Maritxu GUIRESSE de l'ENSAT et à Mme Naaila OUZZANI et Mr Khaled FARES de la Faculté des Sciences Semlalia pour leur accueil chaleureux et leur assistance au cours de la réalisation d'une partie de ce travail.

Je remercie l'ensemble des membres du jury, les Professeurs : BOUMEZZOUGH A, AMBLES A, HAFIDI M, OUZZANI N, PINELLI E, REVEL J-C et YAACOUBI A d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir assisté à ma soutenance de thèse.

Je tiens à dire un immense MERCI à mes collègues des deux laboratoires « Equipe Ecologie Végétale, Sol et Environnement » et « Ecolab ». Ils ont toujours accepté de me donner un coup de main quand c'était nécessaire. Qu'ils soient assurés de mon amicale reconnaissance.

## SOMMAIRE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>I. Secteur oléicole au Maroc.....</b>   | <b>6</b>  |
| I.1 Patrimoine oléicole et production au Maroc.....  | 6         |
| I.1.1 La répartition régionale de la superficie .....  | 6         |
| I.1.2 Profil variétal.....   | 8         |
| I.2 Procédé d'extraction d'huile d'olive.....  | 8         |
| I.2.1 Procédés discontinus ou systèmes à presses.....  | 8         |
| I.2.2 Procédés continus ou systèmes à centrifugation.....  | 9         |
| A. Procédé continu à trois phases.....   | 9         |
| B. Procédé continu à deux phases ou procédé écologique.....  | 11        |
| <b>II. Caractérisation physico-chimique et microbiologique des effluents d'huileries d'olive .....</b> | <b>13</b> |
| II.1 Caractéristiques physico-chimiques.....   | 13        |
| II.2 Caractéristiques microbiologiques.....  | 13        |
| <b>III. Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement.....</b>                          | <b>14</b> |
| III.1 Impact sur les eaux.....   | 14        |
| III.2 Impact sur les sols.....   | 15        |
| III.3 Impact sur les plantes.....  | 15        |
| <b>IV. Procédés de traitement des effluents d'huileries d'olive.....</b>                               | <b>15</b> |
| IV.1 Processus thermique.....  | 16        |
| A. Evaporation naturelle (lagunage).....   | 16        |
| B. Evaporation forcée.....   | 17        |
| C. Incinération.....   | 17        |

|  |           |
|--|-----------|
| D. Distillation.....   | 17        |
| E. Flocculation/clarification.....   | 17        |
| F. Cryo-concentration.....   | 18        |
| IV.2 Procédés physico-chimiques.....   | 18        |
| A. Ultrafiltration/Filtration.....   | 18        |
| B. Ozonation.....  | 18        |
| C. Coagulation.....  | 18        |
| IV.3 Procédés biologiques.....   | 19        |
| A. Traitements anaérobies.....   | 19        |
| B. Traitements aérobies.....   | 19        |
| V. Valorisation des effluents d'huileries d'olive.....   | 21        |
| V.1 Epannage des effluents d'huileries d'olive ou fertirrigation.....                            | 21        |
| V.2 Production de compost.....   | 23        |
| V.3 Alimentation animale.....  | 23        |
| V.4 Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU).....                              | 24        |
| V.5 Production d'enzymes.....  | 25        |
| V.6 Production d'antioxydants naturels.....  | 25        |
| Références Bibliographiques.....   | 26        |
| <b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>Partie I.</b>   |           |
| <b>I. Caractérisation des effluents d'huileries d'olive au cours du traitement biologique.</b>   |           |
| <b>Approches physico-chimiques et spectroscopiques.....</b>                                      | <b>35</b> |
| <b>Chapitre 1.</b>   |           |
| Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater.....        | 36        |
| <b>Chapitre 2.</b>   |           |
| Chemical and spectroscopic analysis of olive mill waste water during a biological treatment..... | 53        |



### Chapitre 3.

|   |    |
|---|----|
| <sup>13</sup> C-NMR study of the effect of aerobic treatment of olive mill wastewater (OMW) on its lipid-free content ..... | 74 |
|---|----|

## II. Caractérisation des effluents d'huileries d'olive au cours du traitement chimique. Approches physico-chimiques et spectroscopiques.....

92

### Chapitre 1.

|   |    |
|---|----|
| Photochemical UV/TiO <sub>2</sub> treatment of olive mill wastewater (OMW)..... | 93 |
|---|----|

### Partie II.

|   |     |
|---|-----|
| Mise en évidence de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive par le test des micronoyaux. Détoxification et valeur agronomique des ces effluents au cours du traitement aérobie..... | 110 |
|---|-----|

### Chapitre 1.

|   |     |
|---|-----|
| Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the <i>Vicia faba</i> micronucleus test..... | 111 |
|---|-----|

### Chapitre 2.

|  |     |
|--|-----|
| Détoxification et valeur agronomique des effluents d'huileries d'olive au cours du traitement aérobie..... | 129 |
|--|-----|

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| SYNTHESE ET CONCLUSION GENERALE..... | 138 |
|--------------------------------------|-----|

|                   |     |
|-------------------|-----|
| PERSPECTIVES..... | 147 |
|-------------------|-----|

|              |     |
|--------------|-----|
| ANNEXES..... | 148 |
|--------------|-----|

# **INTRODUCTION GENERALE**

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "Olea" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est "l'Oléa europaea", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé "Oléa europaea sativa".

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions de pieds d'olivier cultivés sur une superficie de 9.23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95% du patrimoine oléicole mondial (DPV/MADRPM, 1998).

Au Maroc, le secteur oléicole joue un rôle très important sur le plan socio-économique. Il contribue activement à la fixation des populations en milieu rural en créant plus de 11 millions de journées de travail (MAMVA, 1996). La superficie implantée en olivier s'élève à 560 000 ha, soit 5.6% de la superficie mondiale (BLPNTTA, 2003). Le Maroc occupe ainsi le 6<sup>ème</sup> rang après l'Espagne, l'Italie, la Tunisie, la Turquie et la Grèce (IOM, 2003/2004).

La trituration des olives laisse, en plus de sa production principale qui est l'huile, deux résidus, l'un solide (les grignons) et l'autre liquide (les margines). La production mondiale de résidus solides bruts est estimée à environ 2.9 millions de tonnes. Celle des résidus liquides est estimée à 8.4 millions de mètres cubes (Nefzaoui, 1987). Au Maroc, la production annuelle des grignons est estimée 30 000 tonnes (Annaki et Chaouchi, 1999) et celle des résidus liquides à 250 000 de mètres cubes (IOM, 2003/2004).

L'industrie d'extraction d'huile d'olive pose de sérieux problèmes environnementaux. Les effluents d'huileries d'olive ne subissent aucun traitement et sont souvent déversés dans les égouts d'assainissement, stockés dans des bassins d'évaporation ou épandus directement sur le sol. Il en résulte un impact négatif sur l'environnement qui se traduit par le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement d'odeurs nauséabondes (El Hajjouji et al., 2007). Ces problèmes environnementaux sont attribués à la richesse des effluents en matière organique (Galli et al., 1997) et en particulier en polyphénols qui sont responsables d'effets phytotoxiques et antimicrobiens (Sayadi et al., 2000 ; Zenjari et al., 2006).

Le problème des effluents d'huileries d'olive ne se posait pas encore il y a un siècle. Les quantités d'huile d'olive produites alors de manière traditionnelle étaient bien moins importantes que les quantités actuelles et surtout, chacun extrayait son huile d'où une grande

dispersion des polluants qui ainsi pouvaient être résorbés par le pouvoir épurateur des sols. La nature pouvait donc absorber et épurer les déchets de la production d'huile d'olive.

De nos jours, avec la promotion des vertus bénéfiques pour la santé de l'huile d'olive, la demande ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment et les huileries se sont créées pour presser les olives de plusieurs producteurs, formant des points de concentration des polluants non résorbables par le pouvoir épurateur des milieux. Or pour les huileries, la nécessité de produire une huile de qualité, avec le minimum d'impacts négatifs sur l'environnement, est essentielle pour qu'elles puissent rester concurrentielles sur le marché. De plus l'image de pollueur peut nuire à l'image de marque de l'entreprise et peut l'exposer à des sanctions en fonction de la législation qui devient de plus en plus contraignante (Benyahia et Zein, 2003).

Ces considérations ont conduit plusieurs chercheurs à l'échelle nationale et internationale à trouver des applications pour le traitement et la valorisation des effluents d'huileries d'olive (Hamdi et Ellouz, 1993 ; Chimi et al., 1997 ; Paredes et al., 2000 ; Sayadi et al., 2000 ; Hafidi et al., 2005). Ces applications dépendent essentiellement des caractéristiques physico-chimiques des effluents. Ces caractéristiques varient selon la variété des olives triturées, des conditions climatiques, de l'utilisation des engrais et du système de trituration (Zenjari, 2000).

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thématique de recherche développée au sein du laboratoire «Sol et Environnement» à la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech, sur le traitement des déchets d'huileries d'olive et le suivi de l'évolution et les transformations de ces déchets au cours des traitements aérobies.

Le présent travail s'intéresse à l'étude physico-chimique et écotoxicologique des effluents d'huileries d'olive, situés dans la ville de Marrakech, traités par un bioprocédé aérobie. Dans ce sens, nous avons procédé dans un premier temps à la détermination des conditions optimales de traitement aérobie de ces déchets. Cette technique pas très chère, et traditionnellement appliquée par les propriétaires de moulins à proximité des exploitations oléicoles, peut être améliorée et optimisée pour pouvoir accélérer le processus de traitement d'une part et d'autre part pour valoriser le produit final.

Le suivi des transformations de ces déchets est effectué ensuite par différentes méthodes physico-chimiques et spectroscopiques (Analyse élémentaire, Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) et Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN). Ceci permettra une meilleure compréhension des phénomènes d'évolution de la

matière organique au cours du traitement. De même, la fraction lipidique, responsable en partie de la toxicité des déchets d'huileries d'olives, est suivie quantitativement et qualitativement par chromatographie.

Un traitement chimique aux UV/TiO<sub>2</sub> est également appliqué aux effluents d'huileries d'olive. Le devenir de la matière organique au cours de ce traitement est suivi par analyse élémentaire et par spectroscopie UV-visible et IRTF.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive, avant et après traitement aérobie, et en particulier celle des composés phénoliques, reconnus pour leur toxicité et leur phytotoxicité, par le biais du test des micronoyaux en utilisant *Vicia faba* comme plante test. La présence de ces composés phénoliques est déterminée par Chromatography Liquide Haute Pression. La détoxification des effluents traités est mise en évidence par la suite par des essais de génotoxicité et des essais agronomiques.

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Secteur oléicole au Maroc**

L'oléiculture occupe une place importante dans les pays méditerranéens. L'olivier constitue la principale espèce fruitière cultivée au Maroc. Sa faculté à croître et à produire dans diverses situations de culture et son adaptation aux conditions pédo-climatiques les plus critiques ont permis son développement sur pratiquement tout le territoire national.

### **I.1 Patrimoine oléicole et production au Maroc**

L'oliveraie nationale compte actuellement 64 millions de pieds (DPV/MAEE, 1999/2000) couvrant quelques 560 000 ha, représentant 55% de la superficie arboricole nationale. La moyenne des productions annuelles d'olive enregistrée entre 1989/90 et 2002/03 est de l'ordre de 505 000 tonnes. Pour l'année 2003/04, jugée comme exceptionnelle, les estimations des productions d'olive sont de l'ordre de 1 000 000 tonnes (IOM, 2003/2004). La production est caractérisée par des fluctuations inter-annuelles importantes dues à trois facteurs essentiels, à savoir :

- Les conditions climatiques, en particulier la pluviométrie.
- L'alternance, phénomène physiologique caractérisant l'olivier.
- Les techniques d'entretien qui demeurent en général rudimentaires.

#### **I.1.1 La répartition régionale de la superficie**

L'oléiculture s'étale sur tout le territoire national, en raison de la capacité de l'olivier à s'adapter à tous les étages bioclimatiques : du présaharien chaud et sec en culture irriguée, jusqu'au climat tempéré humide (Loussert et Brousse, 1978). Il a donc des rôles multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation de terres agricoles et de fixation des populations dans les zones marginales. L'oléiculture est concentrée dans trois zones principales (tableau 1) (Achkari-Begdouri, 1994 ; DPV/MAEE, 1997) :

- **Zone nord** : dans cette zone, l'oléiculture, en plus de son rôle dans la défense et la restauration des sols, engendre une activité importante notamment en hiver (récolte et extraction de l'huile). La productivité demeure relativement faible au niveau de cette zone, en raison de la prédominance des sols érodés et des techniques de production et d'extraction archaïques.

**Tableau 1.** Répartition géographique du patrimoine oléicole national (BLPNTTA, 2003)

| Zone   | Province régionale                    | Caractéristiques pédo-climatiques   | Superficie<br>(ha) | % par<br>rapport à la<br>superficie<br>nationale |
|--------|---------------------------------------|---|--------------------|--|
| Nord   | Chefchaoun,<br>Taounate,<br>Ouazzane. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pluviométrie importante jusqu'à 1000 mm/an.</li> <li>• Terrains à topographie accidentée.</li> <li>• Sols généralement pauvres</li> </ul>  | 200 000            | 35   |
| Centre | Taza, Fès, Meknès                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pluviométrie entre 450 et 500 mm/an.</li> <li>• Terrains à topographie peu accidentée.</li> <li>• Sols généralement riches et profonds</li> </ul>  | 100 000            | 18   |
| Sud    | Haouz, Tadla, Safi,<br>Essaouira      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pluviométrie &lt; à 400 mm/an.</li> <li>• Irrigation pérenne ou d'appoint.</li> <li>• Sols relativement riches à topographie plane</li> </ul>  | 220 000            | 40   |
| Autre  | Oriental, Sahara                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pluviométrie variable de 200 à 300 mm/an.</li> <li>• Irrigation pérenne ou d'appoint au niveau de l'oriental et des zones sahariennes.</li> <li>• Large gamme de Sols.</li> <li>• Topographie variable.</li> </ul> | 40 000             | 7  |
| Total  |                                       |   | 560 000            | 100  |



- **Zone centre** : dans cette zone les sols sont relativement riches et la pluviométrie est favorable aux exigences de cette espèce
- **Zone sud** : dans cette zone les sols sont favorables à la culture de cette espèce mais l'insuffisance des précipitations, requiert le recours à l'irrigation pour assurer une production régulière.

La zone nord, représentée par les oliviers de Chefchaouen, Taounate et Ouazzane, et la zone Sud, représentée par le Haouz et le Tadla, contribuent à elles seules pour 60% de la superficie totale.

### **I.1.2 Profil variétal**

La picholine marocaine constitue 96% du patrimoine oléicole national (Walali Loudiyi et al., 1984 ; MAMVA, 1996). Le reste, soit 4% est constitué de plusieurs variétés, en particulier la « picholine du Lanquedoc » et « dahbia » qui sont concentrées dans les zones irriguées (Haouz, Tadla, El Kalâa) et quelques variétés espagnoles et italiennes (picual, frantioi, manzanilla, hojibanca...) (MAMVA, 1996).

### **I.2 Procédé d'extraction d'huile d'olive**

Au Maroc et jusqu'à ces dernières décennies, l'extraction de l'huile se faisait par des techniques traditionnelles. Elle était en général réalisée à l'aide de systèmes discontinus de trituration puis de pressage en faisant intervenir la force animale à défaut de l'énergie électrique.

Avec le développement du secteur oléicole, les systèmes traditionnels ont été remplacés par des équipements modernes. Le perfectionnement des procédés a permis d'extraire l'huile en continue à travers des phases successives alors qu'au paravent les processus étaient réalisés de manière discontinue (lavage des olives, broyage mécanique, malaxage, extractions des moûts huileux). De même, après le développement des appareils de centrifugation, la séparation de l'huile des eaux de végétation est devenue moins onéreuse (Francesco, 1993).

#### **I.2.1 Procédés discontinus ou systèmes à presses**

Les unités traditionnelles ont généralement une capacité de trituration qui ne dépasse pas 10 tonnes/jour, leur nombre dépasse actuellement les 160 000 unités au Maroc (IOM,

2003/2004). Les capacités de trituration les plus élevées se localisent dans les provinces de Fès-Taounate, Taza, Marrakech, Chefchaoun et Agadir. Ces cinq régions se présentent par conséquent comme les zones du Maroc où les ressources en eaux sont les plus menacées par les rejets des effluents d'huileries d'olive.

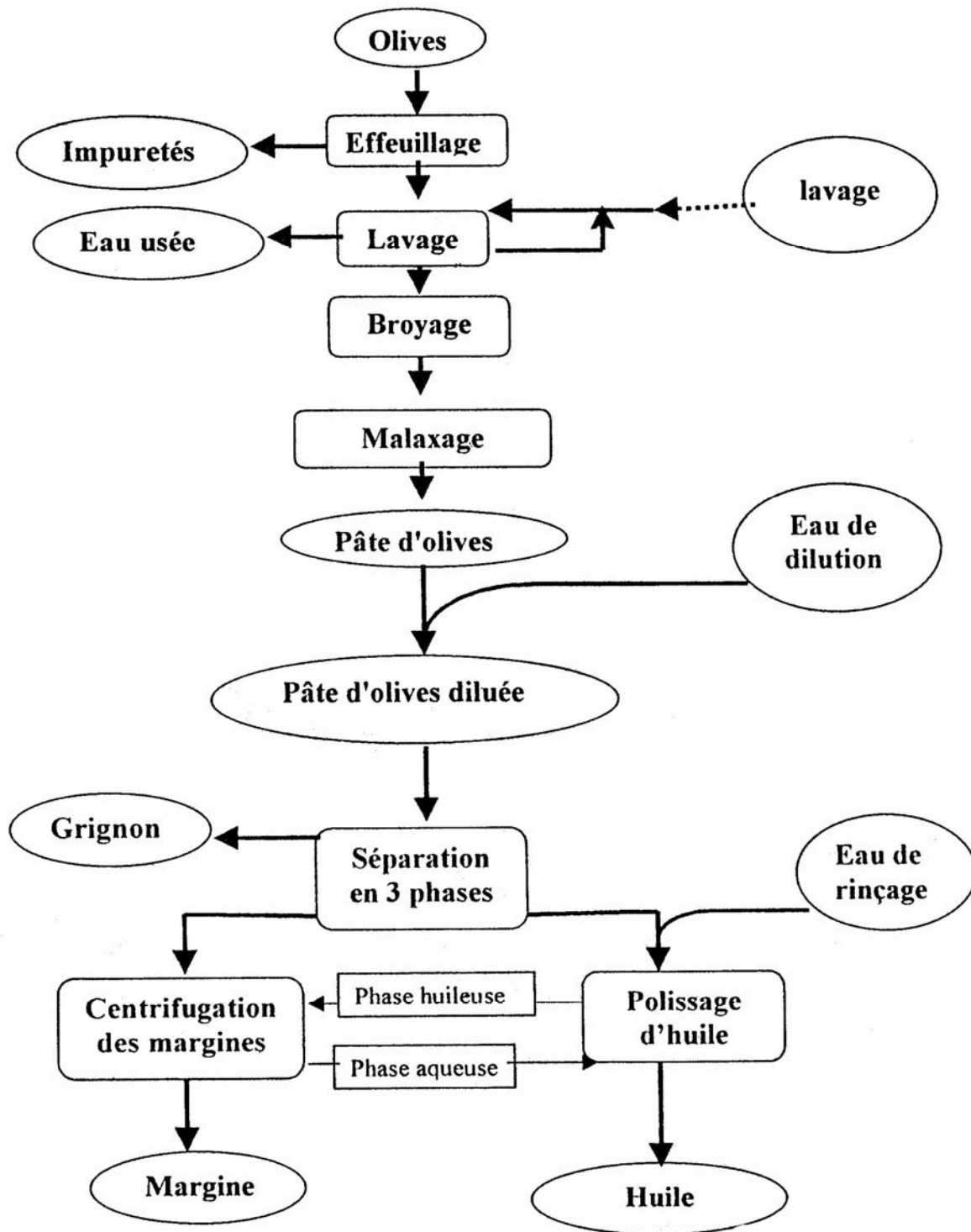
Les systèmes à presses sont des systèmes classiques. Ils commencent par un broyage des olives suivi du malaxage et du pressage. Le sous-produit de cette opération est le grignon brut et un moût fait d'effluents d'huileries d'olive et d'huile. La séparation des deux phases se fait par décantation. Les effluents d'huileries d'olive sont généralement rejetés dans le milieu naturel sans aucun traitement. Par contre les grignons sont utilisés par certaines huileries industrielles pour produire l'huile de grignon par une extraction au solvant ou comme combustible dans des chaudières industrielles, des fours et des bains publics (Hammams).

### **I.2.2 Procédés continus ou systèmes à centrifugation**

Au Maroc, les unités de trituration industrielles sont au nombre de 287 (IOM, 2003/2004). Leur capacité de trituration minimale est supérieure à 10 tonnes/jour. La région de Fès constitue le premier pôle de concentration des unités industrielles avec 42%. Elle est suivie par la région de Marrakech avec 22.4% et par la région de Meknès avec 16.2% des unités. Ces trois provinces assurent la trituration d'environ 50% de la production nationale en olives (IOM, 2003/2004).

#### **A. Procédé continu à trois phases**

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec de l'eau chaude et malaxées pour former la pâte d'olive qui est ensuite diluée. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation donnant les grignons et le moût. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des effluents d'huileries d'olive (figure 1).



**Figure 1.** Procédé d'extraction d'huile d'olive à trois phases (Nefzaoui, 1987).

### **B. Procédé continu à deux phases ou procédé écologique**

Variante du système précédant, ici le décanteur sépare l'huile et mélange le grignon et les eaux de végétation en une unique phase de consistance pâteuse appelée grignon humide ou grignon à deux phases (figure 2).

Ce système permet d'extraire une huile d'olive de bonne qualité sans production d'effluents d'huileries d'olive. Son seul inconvénient est la production de grignons humides. En effet, les grignons résultant de ce procédé contiennent 8 à 10% plus d'eau que ceux du procédé à trois phases. Il est donc indispensable d'équiper les huileries travaillant selon le procédé écologique d'une installation de séchage des grignons.

Ce système écologique a été introduit en Espagne en 1992, en 1995 environ 50% des olives destinées à la production d'huile étaient triturées par ce procédé. Actuellement le gouvernement espagnol ne subventionne que les huileries qui installent le procédé écologique. Ce procédé est également utilisé au Portugal, en Italie, en France et en Grèce (IOM, 2003/2004).

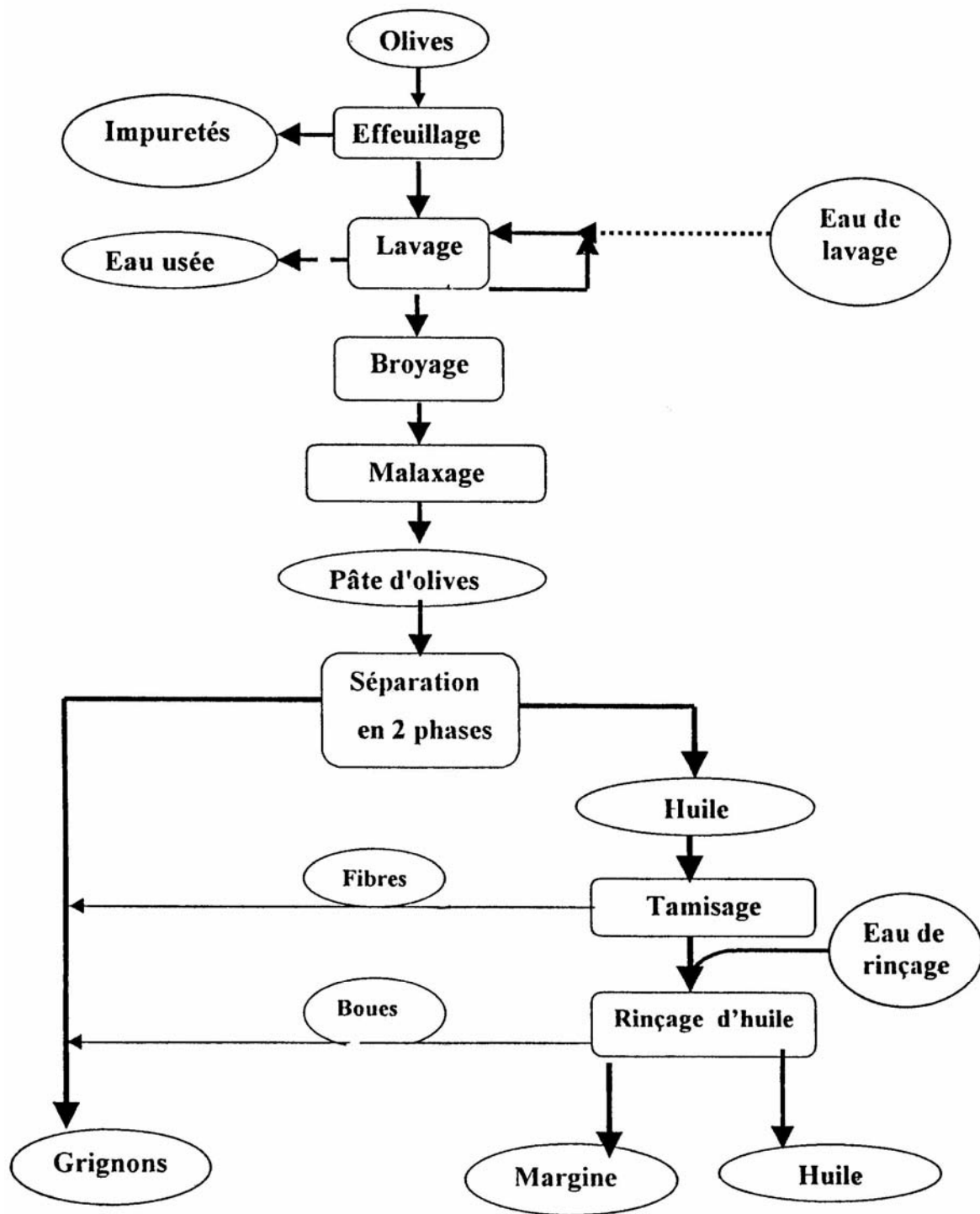


Figure 2. Procédé d'extraction d'huile d'olive à deux phases (Nefzaoui, 1987).

## **II. Caractérisation physico-chimique et microbiologique des effluents d'huileries d'olive**

### **II.1 Caractéristiques physico-chimiques**

Les effluents d'huileries d'olive présentent une composition plus au moins variable. Elle dépend de la qualité des olives, de leur degré de maturité, du système d'extraction et de la qualité d'eau rajoutée lors de la phase d'extraction de l'huile. Les effluents sont généralement constitués de : 83.2% d'eau, 15% de substances organiques et de 1.8% de substances minérales (Fiestas Ros de Ursenos et Borja Padilla, 1992).

Ces effluents se présentent comme un liquide aqueux, de couleur brun-rougeâtre à noir. Ils ont un pH acide (4.2 à 5.9) (COI, 1990 ; Levi-Minzi et al., 1992) et une salinité élevée exprimée en conductivité électrique (18 à 50 mS/cm) (Levi-Minzi et al., 1992) due surtout aux ions potassium, chlorure, calcium et magnésium. Les effluents d'huileries d'olive ont un pouvoir polluant très important avec une demande biologique en oxygène (DBO) de 100 g/L (Balice et al., 1990 ; Rosario et al., 1999) et une demande chimique en oxygène (DCO) de 200 g/L (Balice et al., 1990). Ces valeurs sont 200 à 400 fois supérieures à celles des eaux municipales (Cossu et al., 1993 ; Tabet et al., 2006). La matière organique des effluents d'huileries d'olive est constituée par des polysaccharides (13-53%), des protéines (8-16%), des polyphénols (2-15%), des lipides (1-14%), des polyalcools (3-10%) et des acides organiques (3-10%) (Fiestas Ros de Ursenos et Borja Padilla, 1992). Cette composition résulte de la dégradation des tissus de l'olive au cours de la trituration et de l'extraction de l'huile (Cossu et al., 1993 ; Al Mallah et al., 2000; Centi et al., 2000; Chamkha et al., 2001).

### **II.2 Caractéristiques microbiologiques**

Dans les effluents d'huileries d'olive, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer. Ce sont essentiellement des levures et des moisissures. Dans la plupart des cas, il y a absence de microorganismes pathogènes et ils ne posent alors aucun problème de point de vue sanitaire. Le pouvoir antimicrobien des effluents d'huileries d'olive est lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns ou catécholmélaninique (Hamdi et Ellouz, 1993). Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (Ranalli, 1991). Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en inhibant l'activité

des enzymes digestives et/ou en précipitant les protéines nutritionnelles (Hattenschwiler et Vitousek, 2000).

### **III. Impact des effluents d'huileries d'olive sur l'environnement**

Le rejet des effluents d'huileries d'olive est un problème majeur dans les pays du bassin méditerranéen. Au Maroc, la production annuelle de ces effluents est estimée à environ 250 000 m<sup>3</sup> (IOM, 2003/2004). Ces eaux fortement polluées causent de sérieux dégâts environnementaux. L'absence de méthodes de traitements adaptées pousse les propriétaires de moulins à huile à rejeter ces eaux dans la nature sans aucun contrôle ou à surcharger le réseau d'égouts avec des substances toxiques. La concentration et la charge en matières organiques ne peut qu'entraîner un dysfonctionnement des stations d'épuration.

#### **III.1 Impact sur les eaux**

Les effluents d'huileries d'olive sont peu dégradables à cause des substances phytotoxiques et antimicrobiennes (phénols, acides gras, etc.) qu'ils contiennent. Souvent rejetés dans des récepteurs naturels sans aucun traitement préalable, les effluents d'huileries d'olive nuisent fortement à la qualité des eaux de surfaces. La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution. La très forte charge en DCO et surtout en DBO empêche les eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances (Mebirouk, 2002). Les polyphénols contenus dans les effluents d'huileries d'olive, rejetés dans les cours d'eau de faible débit où l'échange de l'air est limité, exercent une action antagoniste sur la flore et la faune aquatique en causant souvent leur mort. Ces substances peuvent capter facilement l'oxygène dissout, ce qui finit par rendre le milieu totalement anoxique et provoquant ainsi la mort de tous les êtres vivants par asphyxie (Ranalli, 1991).

L'épandage des effluents d'huileries d'olive sur les sols peut également poser des problèmes environnementaux. Les eaux souterraines peuvent être polluées, ce qui affecte la qualité de l'eau potable (Fki et al., 2005). Aussi, l'épandage des effluents d'huileries d'olive, très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates des nappes situées dans la zone ou à proximité de la zone d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable (Benyahia et Zein, 2003) ; or dans le bassin méditerranéen, les ressources en eau sont rares et leur préservation, tant quantitativement que qualitativement est capitale.

Les lipides présents dans les effluents d'huileries d'olive peuvent avoir aussi un impact négatif sur les eaux. Ils forment un film impénétrable à la surface des rivières et ses bords empêchant ainsi la pénétration de la lumière et de l'oxygène (Nassif, 2004).

### **III.2 Impact sur les sols**

L'épandage direct des effluents d'huileries d'olive sur les sols provoque un colmatage des sols et une diminution de leur qualité. Ces déchets sont à l'origine de l'augmentation de la salinité des sols (Fistas Ros de Urcenos, 1981) et de la diminution du pH, qui pourrait être à l'origine du changement des caractéristiques physico-chimiques. De même, les substances toxiques contenues dans ces effluents se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne et détruire la microflore du sol (Marisot et Tournier, 1986).

### **III.3 Impact sur les plantes**

Les composés phénoliques sont les responsables majeurs de la phytotoxicité des effluents d'huileries d'olive. L'application directe des effluents d'huileries d'olive bruts diminue les rendements en matière sèche des tomates et du soja (Samperdro et al., 2004) et inhibe la germination de quelques graines comme le pin, la tomate et l'atriplex (DellaGreca et al., 2001 ; Muscolo et al., 2001). Les résidus de pesticides présents dans les effluents d'huileries d'olive peuvent également être nocifs pour les plantes.

Par conséquent, l'utilisation agronomique par épandage direct des déchets d'huileries d'olive a de mauvaises répercussions sur les eaux, les sols, les microorganismes et les plantes. D'où la nécessité de traiter ces effluents afin de palier aux problèmes environnementaux qu'ils engendrent. Dans ce sens, plusieurs travaux ont été effectués pour remédier à ce problème.

## **IV. Procédés de traitement des effluents d'huileries d'olive**

A partir des années soixante-dix, les effluents d'huileries d'olive ont fait l'objet d'une grande attention de la part des institutions scientifiques, des entreprises et des organismes publics afin d'étudier et de proposer les meilleures technologies en matière de minimisation des impacts environnementaux, de valorisation ou d'élimination. Compte tenu de leur composition et de leur pourcentage en matière organique (10 à 25%) (El Alami, 2000), les effluents d'huileries d'olive seuls ne peuvent constituer un produit de valeur ajoutée



intéressante. Enrichis, mélangés à d'autres résidus, concentrés, séchés et /ou purifiés, ils peuvent être valorisés et employés pour la production de certains composants plus utiles. Dans les travaux scientifiques, on trouve plus de 20 procédés ou technologies applicables au traitement des effluents d'huileries d'olive. Il s'agit dans la plupart des cas d'opérations élémentaires ou combinées essayées au laboratoire ou dans une installation pilote, sans projection industrielle réelle. Les techniques suivantes ont été décrites comme les plus utilisées ou comme étant potentiellement applicables. Ces techniques de traitement peuvent être classées en procédés thermiques, physico-chimiques et biologiques.

#### **IV.1 Processus thermique**

##### **A. Evaporation naturelle (lagunage)**

Les effluents d'huileries d'olive sont placés dans des bassins ou étangs d'évaporation de profondeur de 0.7 à 1.5 m (El Alami, 2000). Cette profondeur est choisie pour assurer une évaporation totale avant la campagne oléicole suivante. Après séchage, les effluents d'huileries d'olive sont, soit incinérés soit utilisés comme engrais organique ou comme additifs dans un compostage ou tout simplement jetés à la décharge.

L'évaporation naturelle est tributaire des conditions climatiques. Elle dépend étroitement de la vitesse du vent, du degré d'ensoleillement et de l'humidité de l'air. Cette méthode permet la diminution du volume des effluents d'huileries d'olive écoulés dans les réseaux hydrauliques superficiels ou dans les réseaux de collecte des eaux usées. Elle présente beaucoup d'avantages à savoir :

- La simplicité de fonctionnement : ces installations ne nécessitent pas de travaux de maintenance réguliers, seuls une surveillance périodique du site et un curage tous les 3 à 5 ans sont nécessaires ;
- L'autoépuration pendant l'évaporation qui se fait par les microorganismes présents dans les effluents d'huileries d'olive ;
- Le coût d'investissement et d'exploitation faible.

Néanmoins, ce procédé présente les inconvénients suivants :

- Le transport des effluents d'huileries d'olive jusqu'au site du traitement ;
- La nécessité de grandes surfaces pour le séchage à cause du développement d'un film imperméable gênant l'évaporation ;
- Le dégagement d'odeurs indésirables ;

- La pollution éventuelle des nappes phréatiques si l'étanchéité des bassins n'est pas parfaite.

### **B. Evaporation forcée**

Les effluents d'huileries d'olive sont pompés à partir de bassins de stockage, puis projetés par des asperseurs sur des panneaux juxtaposés, ayant une importante surface d'échange avec l'air (Nucleos de Interface, 1992).

Ce système est généralement applicable lorsque la température de l'air est supérieure à 10°C et le taux d'hygrométrie inférieur à 80%. En effet, plus la température est élevée, plus l'hygrométrie relative est faible et plus les quantités d'eaux évaporées par l'air avant la saturation sont importantes. Les inconvénients de cette méthode sont : le dégagement des mauvaises odeurs, l'évaporation de composés organiques et la possible mise en suspension d'aérosols s'il y a du vent.

### **C. Incinération**

L'incinération consiste à éliminer les effluents d'huileries d'olive par combustion. Pour éliminer l'excès d'eau, on est obligé d'utiliser un combustible supplémentaire soit les noyaux d'olives, soit d'autres combustibles comme le gas-oil. Ce procédé est complexe et coûteux tant à l'investissement qu'à l'exploitation (Fiestas Ros de Ursenos, 1983 ; Ranalli, 1991).

### **D. Distillation**

Les effluents d'huileries d'olive peuvent être concentrés à l'aide d'un distillateur. Ce processus permet de réduire le volume de ces effluents de 70% et le résidu peut être utilisé comme combustible pour chauffer le distillateur ou comme fertilisant dans l'agriculture. L'eau condensée peut être réutilisée après une épuration adéquate dans les processus des huileries (Ranalli, 1991).

### **E. Flocculation/clarification**

Elle consiste à traiter les effluents d'huileries d'olive avec des produits tensioactifs afin d'éliminer les solides et les colloïdes en suspension.

Une expérimentation avec de la chaux a montré une réduction de la DCO de 40 à 50% (Mendia et Procino, 1964). Ce traitement peut être utilisé après un traitement biologique pour éliminer les matières en suspension et les polluants résiduels.

L'inconvénient majeur de ce procédé réside dans le fait qu'on a seulement un transfert de la pollution de l'état solide à l'état pâteux. De même, la plupart des composés organiques qui se trouvent dans les effluents d'huileries d'olive sont difficiles à précipiter (sucres, acides volatiles).

### **F. Cryo-concentration**

Ce processus se base sur le fait que les effluents d'huileries d'olive, en se refroidissant jusqu'à la congélation, se séparent, d'une part en un sirop constitué de substances organiques et de l'eau résiduelle, et d'autre part en cristaux de glace qui à cause de leur faible densité flottent sur le sirop (El Alami, 2000). Ce processus ne conduit pas à l'élimination des polluants, mais provoque leur concentration.

## **IV.2 Procédés physico-chimiques**

### **A. Ultrafiltration/Filtration**

L'ultrafiltration est un procédé de séparation physique utilisant une membrane. Elle s'applique à la séparation des particules de 0.005 à 0.1µm. Cependant, pour les particules les plus petites, on utilise la nanofiltration. On obtient une phase liquide contenant les polluants dissous d'une part et une phase pâteuse contenant les phases solides.

### **B. Ozonation**

L'ozonation consiste à l'utilisation de l'ozone,  $O_3$  comme produit d'oxydation qui permet la destruction d'un grand nombre de micropolluants et l'amélioration des odeurs. La réduction de la pollution par ce procédé est très limitée et les réactifs sont très coûteux.

### **C. Coagulation**

Elle consiste à favoriser l'agglomération des particules hydrophiles par des tensioactifs. Les principaux agents de coagulation utilisés sont à base du sel d'aluminium et du fer. Dans certains cas, des produits synthétiques tels, le chlorure ferrique et la chaux sont utilisés. On obtient une phase liquide où les polluants sont dilués et des boues dans lesquelles les polluants sont concentrés.

### **IV.3 Procédés biologiques**

Ces procédés consistent à utiliser les microorganismes pour dégrader les composés organiques des effluents d'huileries d'olive. Ils sont subdivisés en processus aérobie et anaérobie.

#### **A. Traitements anaérobies**

Les traitements anaérobies sont adaptés à plusieurs types de résidus : biomasse humide, sous-produits agricoles, déchets des eaux résiduaires. Ils sont le plus utilisés pour le traitement et l'exploitation des effluents d'huileries d'olive à cause de leur charge élevée en matière organique (Fiestas Ros de Ursenos et al., 1981 ; Hamdi et al., 1991 ; Borja et al., 1994).

Des études ont montré que pour une efficacité d'épuration de 80%, il faut un temps de rétention de seulement 20 jours, avec en plus l'avantage de produire une quantité non négligeable du biogaz : 855 litres/ kg de matière organique digérée (El Alami, 2000).

La digestion anaérobie permet une réduction de DCO de l'ordre de 70 à 85%. Son rendement est proportionnel à la concentration en microorganismes et varie largement selon la nature du support (montmorillonite ou sepiolite) (Martin et al., 1991). Cependant, cette digestion peut être inhibée par les acides gras à chaînes longues, notamment l'acide oléique (Koster et Cramer, 1980). De même à partir d'une concentration de 100 mg/L d'acides phénoliques dans les effluents d'huileries d'olive, les bactéries méthanogènes sont inhibées (Hamdi et al., 1991).

Ces traitements anaérobies permettent de réduire la consommation en énergie et la production des boues (Borja et al., 1995). Ils présentent aussi l'avantage de produire du méthane et de limiter les dégagements de mauvaises odeurs. Par contre, ils sont aussi très limités et ce à cause de la toxicité élevée des composés phénoliques et des tanins, de la faible biodégradabilité des polymères de couleur foncée et de l'acidification des réacteurs (Mouncif et al., 1995).

#### **B. Traitements aérobies**

Les effluents d'huileries d'olive étant très chargés en matière organique, ils ne peuvent pas être traités directement par voie aérobie. De ce fait plusieurs auteurs ont recommandé de les diluer avant leur traitement, soit avec l'eau (El Hajjouji et al., 2007), soit avec des eaux

usées domestiques (Annaki et Chaouchi, 1999). Balice et al. (1988) ont recommandé de diluer les effluents d'huileries d'olive 70 fois avec de l'eau claire non polluée lors de leur épuration avec les boues activées.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur le traitement et le pré-traitement des effluents d'huileries d'olive par voie aérobie en utilisant des souches de microorganismes telles que les basidiomycètes (Dias Albino et al., 2004), *Pleurotus ostreatus* (Fountoulakis et al., 2003) et *Aspergillus niger* (Cereti et al., 2004) en raison de leur grand pouvoir de dégrader les composés phénoliques (Hamdi et Ellouz, 1993). Les tests de toxicité ont montré une diminution de la toxicité des effluents d'huileries d'olive après traitement par ces microorganismes. En effet, les microorganismes aérobies dégradent les composés organiques par oxydation avec l'oxygène de l'air ou l'oxygène pur et utilisent la plupart de ces composés organiques présents dans le milieu pour leur nutrition et leur reproduction.

D'autres auteurs ont utilisé des suspensions mixtes de microorganismes et ont abouti à des abattements très importants en termes de DCO et de polyphénols (Zenjari et al., 1999 ; Hafidi et al., 2005). Ces abattements sont très variables et varient en fonction de la performance des souches sélectionnées. Certaines souches de bactéries et de champignons ont été également testées pour décolorer les effluents d'huileries d'olive et réduire leur toxicité, parmi ces microorganismes on peut citer : *Bacillus pumilus* (Ramos, 1986) ; *Coriolus versicolor* et *Funalia troggi* (Yesilada et al., 1998) ; *Phanerochaete chrysosporium* (Sayadi et al., 1996) et *Pleurotus ostreatus* (Martirani et al., 1996).

Les procédés aérobies tels que les boues activées sont aussi utilisés pour éliminer les polluants dissous et colloïdaux à faibles concentrations dans les eaux usées. Toutefois, les concentrations élevées en matière organique peuvent être tolérées lorsque le temps de rétention est long et/ou avec un pourcentage de recyclage élevé. Les effluents d'huileries d'olive étant très chargés en matière organique ne peuvent pas être traités directement par ces procédés.

L'inconvénient majeur du traitement aérobie est la consommation importante d'oxygène. Dans le but de réduire cette consommation ainsi que la toxicité des effluents d'huileries d'olive vis-à-vis des microorganismes épurateurs, des prétraitements physiques de ces déchets (filtration, distillation, évaporation) ont été recommandés par plusieurs auteurs.

L'utilisation de ces deux procédés à la fois (physique et biologique) a permis d'avoir de meilleurs résultats par rapport à l'utilisation d'un procédé biologique direct (Zenjari, 2000).

## **V. Valorisation des effluents d'huileries d'olive**

Les effluents d'huileries d'olive sont riches en matière organique, en sels minéraux notamment en potassium, en magnésium et en phosphore. De nombreux travaux ont été réalisés pour la valorisation et l'utilisation de ces effluents, parmi ces applications on peut citer :

### **V.1 Epannage des effluents d'huileries d'olive ou fertirrigation**

La première proposition pour l'emploi des effluents d'huileries d'olive pour la fertirrigation remonte à 1942 (Chimi, 1997), mais depuis, l'opinion des chercheurs semble très partagée. Certains mettent en évidence des phénomènes éventuels de pollution ou encore des phénomènes qui seraient plus nuisibles que bénéfiques.

De nombreuses recherches ont été publiées sur les effets de l'épandage des effluents d'huileries d'olive frais, directement ou après traitement, sur des sols plantés de céréales et d'autres cultures annuelles (Caporali et al., 1996), de vignes (Catalano et Felice, 1989; Di Giovacchino, 2001) et d'oliviers (Catalano et al., 1985; Lombardo et al., 1993). Les résultats obtenus ont montré que l'épandage des effluents d'huileries d'olive sur les sols agricoles avait généralement des effets positifs sur la productivité de la plante, sur les caractéristiques du sol, et sur le nombre et la diversité des microorganismes présents dans le sol (Di Giovacchino, 2002).

L'épandage des effluents d'huileries d'olive, pendant une longue période sur des sols plantés de maïs, entre 1987 et 1993, ne montre aucune différence significative dans la productivité de la culture (Di Giovacchino et al., 2002). Les meilleurs résultats agronomiques sont obtenus sur des parcelles ayant reçues  $50 \text{ l/m}^2$  d'effluents d'huileries d'olive, qui apportent: 29.1 t/ha de matière organique sèche, 750 kg/ha de potassium (élément), 249.5 kg/ha d'azote (élément) et 82 kg/ha de phosphore (élément) (Di Giovacchino et al., 2002).

L'épandage des effluents d'huileries d'olive sur des sols agricoles peut constituer le moyen le plus économique pour résoudre le problème de l'écoulement de ce sous produit mais également le plus utile, puisqu'il peut être utilisé sur le sol pour remplacer partiellement ou totalement les fertilisants chimiques. De même, dans les régions arides, l'apport des effluents

d'huileries d'olive peut contribuer à l'enrichissement des sols en matière organique et améliorer la capacité de rétention en eau des sols et leur résistance à l'érosion.

Ainsi, dans l'ensemble, les résultats ne semblent pas contre indiquer l'épandage des effluents d'huileries d'olive sur les terres agricoles. Toutefois, cette pratique présente un certain nombre de contraintes qui limitent son extension, à savoir :

- La salinité : les valeurs de salinité des effluents d'huileries d'olive dépassent de loin les valeurs préconisées pour l'irrigation. La conductivité varie entre 18 et 50 mS/cm (Levi-Minzi et al., 1992), le taux de sodium est très élevé ce qui va entraîner un risque de sodisation très fort.
- pH acide : le sol présente un pouvoir tampon capable d'ajuster son pH après épandage des effluents d'huileries d'olive acides. Ce pouvoir risquerait d'être dépassé à long terme, ce qui peut justifier que certains pays comme l'Espagne, l'Italie préconisent le conditionnement préventif et la neutralisation à la chaux des effluents d'huileries d'olive avant leur utilisation en agriculture (El Alami, 2000). Sur des sols fortement calcaires, il n'y a pas de risque important.
- Polyphénols : ces derniers sont dotés d'un pouvoir antimicrobien et induisent un effet phytotoxique qui disparaît en général au plus tard deux mois après l'épandage. Certains auteurs recommandent d'épandre les effluents d'huileries d'olive pendant la période de repos végétatif pour les cultures ligneuses et au moins trois semaines avant le semis pour les cultures herbacées.
- Imperméabilité du sol : ceci peut être la conséquence de l'accumulation des huiles résiduelles en émulsion.
- Immobilisation de l'azote dans le sol : la matière organique des effluents d'huileries d'olive présente un rapport C/N très élevé (54.6 à 151.6) (El Alami, 2000). L'épandage des effluents d'huileries d'olive sur le sol conduirait l'activité biologique vers l'immobilisation de l'azote du sol dans les cellules microbiennes. En effet, la matière organique des effluents d'huileries d'olive est assez pauvre en azote. Par conséquent, lors de la minéralisation, les microbes prélèvent l'azote du sol au détriment de la culture causant ainsi le

phénomène de « faim d'azote ». Afin d'éviter ce problème, un apport d'engrais azoté minéral au moment de l'épandage s'impose.

## **V.2 Production de compost**

Le compostage est une des solutions proposées afin de valoriser les effluents d'huileries d'olive. Ce processus est traditionnellement réalisé en Espagne dans des bassins d'évaporation où les effluents d'huileries d'olive sont compostés avec des résidus secs agricoles ou forestiers, sous des conditions contrôlées de température et d'humidité (Papadimitriou et al., 1997).

Le compostage a pour but la transformation des matières organiques en substances humiques, tout en détruisant les parasites et les micro-organismes pathogènes. La libération de mauvaises odeurs lors du compostage, est fortement réduite car les composés organiques qui restent après le processus sont relativement stables avec de faibles taux de décomposition. Le compost est une source de matière organique pour la construction et la maintenance de l'humus du sol. Il peut améliorer la croissance et la vigueur des cultures, réduire les pathogènes des plantes et améliorer la résistance de celles-ci aux maladies (Ezelin, 1998). Les composts contiennent des nutriments incluant l'azote, le phosphore et des oligo-éléments essentiels. Le contenu en nutriments du compost est lié à la qualité des substrats organiques d'origine. Dans la plupart des cas, les composts contiennent des taux de nutriments trop faibles pour être qualifiés de fertilisants.

L'apport du compost peut s'effectuer en fonction d'un calendrier traditionnel, les éléments fertilisants sont mieux intégrés dans le complexe humique et sont mis progressivement à la disposition de la plante par la biodégradation de la matière organique, de ce fait ils sont moins susceptibles de s'infiltrer vers la nappe.

## **V.3 Alimentation animale**

Les effluents d'huileries d'olive ont été utilisés directement comme boisson pour le bétail et ils ont été donnés à des volailles à la place de l'eau potable (Fadeli, 1977). Ces expériences ont montré un abaissement du taux de mortalité de ces animaux et une diminution de leur coût par kilo de viande produite.

Cependant, l'apport des effluents d'huileries d'olive déshydratés aux ruminants provoque des diarrhées en raison de leur taux élevé en sodium et en composés phénoliques



(Salvemini et Cera, 1984). De ce fait une application directe des effluents d'huileries d'olive bruts est à proscrire. Chimi (1997) a montré que l'ajout de protéines à l'aliment de bétail semble remédier au problème de diarrhées en réduisant l'effet inhibiteur des composés phénoliques.

#### V.4 Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU)

L'obtention des protéines unicellulaire constitue une des solutions optimale pour la valorisation des effluents d'huileries d'olive. La plupart des procédés appliqués sont basés sur l'utilisation des levures capables de transformer les substances organiques en biomasse à haut contenu en protéines et vitamines de grande valeur pour l'alimentation animale et même humaine (El Alami, 2000).

L'usage des microorganismes pour la production des POU peut être considéré comme un prétraitement pour les eaux résiduelles à charge organique élevée, permettant d'obtenir d'une part, une diminution de 50 à 70% de la charge polluante et d'autre part, une biomasse protéique qu'on peut utiliser pour l'alimentation animale (Zenjari, 2000).

Les microorganismes les plus utilisés et les plus adaptés pour la production de POU sont représentés dans le tableau 2 :

**Tableau 2.** Levures pour la production de protéines d'organismes unicellulaire à partir des effluents d'huileries d'olive (Hamdi, 1993).

| Souche                             | Biomasse (g/L) |
|------------------------------------|----------------|
| <i>Torulopsis utilis</i>           | 13             |
| <i>Saccharomycopsis lipolitica</i> | 18-26          |
| <i>Saccharomyces Candida</i>       | 20-26          |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    | 30             |

Selon Hamdi (1993), l'emploi de ce genre de POU pour l'alimentation animale est limité par les composés phénoliques qui se fixent sur les levures. Ces dernières s'avèrent incapable de dégrader les pectines, les tanins et les polyphénols.

De même, l'utilisation des moisissures comme *Aspergillus sp* et *Geotrichium codidum* donne une biomasse très digestible avec une teneur en protéines brutes allant jusqu'à 30%, bien que ces microorganismes présentent l'inconvénient de se développer plus lentement que les levures (Hamdi, 1993).

### **V.5 Production d'enzymes**

Les effluents d'huileries d'olive peuvent être utilisés comme milieu pour la production d'enzymes en utilisant des microorganismes.

Cultivées sur les effluents d'huileries d'olive, *Cryptococcus albidus* permet une production de 13 UI/ml de pectinases en 48 heures. Cette production peut être améliorée à 29.6 UI/ml en éliminant les phénols par floculation-clarification (Francesco, 1993). La réutilisation de ces enzymes pectinolytiques dans le processus mécanique d'extraction de l'huile d'olive permet d'augmenter le rendement en huile (Petruciol et al., 1988).

### **V.6 Production d'antioxydants naturels**

L'huile d'olive est classée parmi les huiles végétales les plus résistantes à l'autoxydation. Cette stabilité oxydative est fortement liée à la teneur en composés phénoliques totaux. Cette résistance à l'oxydation des huiles vierges diminue assez rapidement quand on élimine les polyphénols par extraction au méthanol (Montedero et al., 1980).

Des chercheurs ont proposé d'extraire les composés phénoliques des effluents d'huileries d'olive pour les valoriser en tant qu'antioxydants naturels. Parmi les composés les plus utilisés on peut citer l'acide caféique, le tyrosol et l'acide 4-hydroxybenzoïque. Ces derniers sont des précurseurs très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique (Knupp et al., 1996).

## Références Bibliographiques

- Achkari-Begdouri A. (1994). Problématiques des margines produites par les huileries et possibilités de valorisation et de traitement. Ministère de l'intérieur, Maroc.
- Al Mallah K., Asma O.J., Abu Lail N.I. (2000). Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Separation and Purification Technology*. 20, 225-234.
- Annaki A., Chaouchi M. (1999). Traitement des margines mélangées avec les eaux usées urbaines par digestion aérobie. *Revue Marocaine du génie civil*, N° 83, septembre/octobre, pp 53-57.
- Balice V., Carrieri C., Cera O., Rindone B. (1988). The fate of tannin-like compounds from olive mill effluents in biological treatments. In Hill and Robinson: Proceedings of the Fifth International Symposium on anaerobic digest.
- Balice V., Carrieri C., Cera O. (1990). Caratteristiche delle acque di vegetazione. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*. 67, 9-16.
- Benyahia N., Zein K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) à SESEC II, pp 2-7.
- BLPNTTA (2003). Bulletin de Liaison de Programme National de Transfert de Technologies en Agriculture. L'amendier, l'olivier, le figuier, le grenadier. Vol 105.
- Borja R., Martin A., Alonso V., Garcia I., Banks C.J. (1994). Influence of different aerobic pre-treatment on the kinetic of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research*. 19, 489-495.
- Borja R., Martin A., Alonso V., Garcia I., Banks C.J. (1995). Influence of different aerobic pretreatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill waste water. *Pergamon*. 2, 489-495.
- Caporali F., Anelli G., Paolini R., Campiglia E., Benedetti G., Contini M. (1996). Crop application of treated waste waters from olive oil extraction. *Agricoltura Mediterranea*. 123, 273-280.
- CAR/PP. (2000). Centre d'activités régionales pour la production propre. Prévention de la pollution dans la production d'huile d'olive. 140 p.
- Catalano M., Gomes T., de Felice M., De Leonardis T. (1985). Smaltimento delle acque di vegetazione dei frantoi oleari. *Inquinam*, pp 27-87.

- Catalano M., de Felice M. (1989). Utilizzazione delle acque reflue come fertilizzante, in *Anti del Seminario Internazionale Tecnologie e impianti per il trattamento dei reflui dei frantoi oleari*, Lecce.
- Centi G., Perathoner S., Torre T., Verduna M.G. (2000). Catalytic wet oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of carboxylic acids on homogeneous and heterogeneous Fenton type catalysts. *Catalysis Today*. 55, 6-69.
- Cereti C.F., Rossini F., Federici F., Quarantino D., Vassilev N., Fenice M. (2004). Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertiliser for wheat (*Triticum durum* Desf.). *Bioresource Technology*. 91, 135-140.
- Chamkha M., Patel B.K.C., Garcia J.L., Labat M. (2001). Isolation of clostridium biofermentants from oil mill wastewater converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of species. *Anaerobe*. 7, 189-197.
- Chimi H. (1997). *Cours International sur l'Amélioration de la qualité de l'huile d'olive*. Office Régionale de Mise en Valeur Agricole du Haouz Marrakech. 7p.
- C.O.I. (1990). *Amélioration de la qualité de l'huile d'olive*. Conseil Oléicole International-Madrid.
- Cossu R., Blakey N., Cannas P. (1993). Influence of codisposal of municipal solid waste and olive vegetation water on anaerobic digestion of sanitary landfill. *Water Sciences Technology*. 27, 261-271.
- DellaGreca M., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtera L., Temussi F. (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 67, 352-359.
- Dias Albino A., Bezerra M., Nazare P.A. (2004). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill waste water. *Bioresource Technology*. 92, 7-13.
- Di Giovacchino L., Basti C., Costantini N., Ferrante M.L., Surricchio G. (2001). Effects of olive vegetable water spreading in the soil cultivated with maize and grapevine. *Agricoltura Mediterranea*. 131, 33-41.
- Di Giovacchino L., Basti C., Costantini N., Surricchio G., Ferrante D., Lombardi D. (2002). Effet de l'épandage des eaux de végétation des olives sur des sols complantés de maïs et de vigne. *Olivae*. 91, 37-43.

- DPV/MAEE. (1997). Rapport principal. Plan national oléicole 1998-2010. Direction de Production Végétale, Ministère de l'Agriculture, de l'Équipement et de l'Environnement, Département de l'Agriculture.
- DPV/MADRPM. (1998). Commercialisation et transformation des olives. Division des projets de Mise en Valeur et de l'Industrie Agricole. Direction de la Production Végétale. Effect of waste waters from olive oil extraction plants of the bacterial of soil. *Chemosphere*. 15, 659-664.
- DPV/MAEE. (1999/2000). In *Matin du Sahara et du Maghreb*. Direction de la Production Végétale, Ministère de l'Agriculture, de l'Équipement et de l'Environnement, Département de l'Agriculture.
- El Alami B. (2000). Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. Mémoire de 3ème cycle, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. 93 p.
- El Hajjouji H., Fakharedine N., Ait Baddi G., Winterton P., Bailly J.R., Revel J.C., Hafidi M. (2007). Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation, An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*. 98, 3513-3520.
- Ezelin De Souza K. (1998). Contribution à la valorisation de la bagasse par transformation biologique et chimique. Valeur agronomique des composts et propriétés suppressives vis-vis du champignon phytopathogène *Fusarium solanum*. Thèse de troisième cycle. Institut national polytechnique de Toulouse. 386 p.
- Fadeli E. (1977). Lipids of olives. *Process Chemistry of Fats and other lipids*. 15, 57-74.
- Fiestas Ros de Ursenos J.A. (1981). Différentes utilisations des margines : Actes séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. FAO-UNDP. Tunisie, pp 93-110.
- Fiestas Ros de Ursenos A.J., Navarro G.R., Leon C.R., Garcia A.J., Maestro G.M. (1983). Epuration des margines par digestion anaérobie en vue de leur utilisation comme source d'énergie, valorisation des sous-produits de l'olivier, pp 131-139.
- Fiestas J.A., Borja R. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater : current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*. 43, 101-106.
- Fki I., Allouche N., Sayadi S. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenol acetic acid from olive mill wastewater for the

- stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*. 93, 197-204.
- Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*. 36, 4735-4744.
- Francesco GL. (1993). Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae*. 74, 15-20.
- Galli E., Pasetti L., Fiorelli F., Tomati U. (1997). Olive-mill waste water composting. Microbiological aspect. *Waste Management and Research*. 15, 323-330.
- Hafidi M., Amir S., Revel J.C. (2005). Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C NMR. *Process Biochemistry*. 40, 2615-2622.
- Hamdi M. (1993). Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olive: l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*. 46, 20-24.
- Hamdi M., Ellouz R. (1993). Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environmental Technology*. 19, 183-188.
- Hamdi M., Kadir A., Garcia A.L. (1991). The use of *Aspergillus niger* for bioconversion of olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34, 828-831.
- Hattenschwiler S., Vitousek P.M. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *TREE*. 15, 238-243.
- IOM. (2003/2004). Industrie oléicole au Maroc et son impact sur l'environnement : Propositions d'actions de lutte contre la pollution générée par les huileries d'olives, cas de la province de Taounate. 14 p.
- Knupp G., Rücker G., Ramos-Cormenzana A., Garrido Hoyos S., Neugebauer M., Ossenkop T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 38, 277-282.
- Koster I.W., Cramer A. (1980). Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long chain fatty acids. *Applied Environmental Microbiology*. 53, 403-409.
- Levi-Minzi R., Saviozzi R., Riffaldi A.R., Falzo L. (1992). L'épandage au champ des margines : effets sur les propriétés du sol. *Olivae*. 40, 20-25.

- Lombardo N., Briccoli-Bati C., Marsilio V., Di Giovacchino L. (1993). Comportamento vegeto-produttivo di un oliveto trattato con acque di vegetazione. Atti del Convegno. Tecniche, norme e qualità in Olivicoltura. Potenza. I, 97-107.
- Loussert R., Brousse G. (1978). L'olivier, techniques agricoles et production méditerranéenne. Ed. G.P. maison neuve de Larose Paris. 464 p.
- MAMVA. (1996). Ministère de l'Agriculture, de l'Équipement et de l'Environnement Plan d'action oléicole. Division de la production végétale, pp 45-50.
- Marisot A., Tournier J.P. (1986). Répercussions agronomique de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive. Agronomie. 6, 235-241.
- Martin A., Borja R., Garcia I., Fiestas J.I. (1981). Kinetics of methane production from olive mill wastewater. Process Biochemistry. 26, 101-107.
- Martirani L., Giardina P., Marzullo L., Sannia G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive mill wastewaters with *Pleurotus ostreatus*. Water Research. 8, 1914-1918.
- Mebirouk M. (2002). Rejets des huileries. Développement d'un procédé intégré dans la biodégradation des polyphénols dans la margine. CMPP News, n°11.
- Mendia L., Procino L. (1964). Studio sul trattamento delle acque di rifiuto dei frantoi oleari. Pro. ANDIS conference, Bologna, Italy.
- Montedero G., Anichini F., Fantazzo P. (1980). Composés phénoliques de l'huile d'olive, leur influence sur la technologie d'extraction, sur la résistance à l'oxydation et sur les caractéristiques organoleptiques de l'huile. Bulletin liaison Groupe Polyphénols. 9, 39-55.
- Mouncif M., Tamoh S., Faid M., Achkari-Begdouri A., Lhadi K. (1995). Biotechnological valorization and treatment of olive mill waste waters by selected yeast strains. Grasas y aceites. 44, 335-338.
- Muscolo A., Panuccio M.R., Sidari M. (2001). The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. Plant Growth Regulation. 35, 31-35.
- Nassif D. (2004). Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies, Université Libanaise, Liban. 41 p.

- Nefzaoui A. (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits, séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis, 20-22 Janvier. Science et Technique, Olivae n° 19.
- Nucleos de Interface. (1992). Ministerio de obras publicas y transportes confederacion hifrografica de guadalquivir.
- Paredes C., Roig A., Bernal M.P., Sanchez Monedero M.A., Cegarra J. (2000). Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biology and Fertility Soils*. 32, 222-227.
- Petruciol M., Servili M., Montedero G.F., Federici F. (1988). Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process. *Biotechnology Letters*. 1, 55-60.
- Ramos A. (1986). Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. *Proc. International symposium of olive by-products valorisation*. FAO.UNDP, Sevilla, Spain, pp 19-40.
- Ranalli A. (1991). L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. *Références aux normes italiennes en la matière*. Olivae. 39, 18-34.
- Rosario L., Ana R., Bernardo M., Gerardo A.C., Antonio G. (1999). Biodegradation of olive mill wastewaters (OMW) by strains of *Scopulariopsis* sp. Isolated from OMW-contaminated habitats. *Toxicology and Environmental Chemistry*. 72, 127-134.
- Salvemini V., Cera O. (1984). Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grassas y Aceites*. 25, 178-180.
- Samperdro I., Aranda E., Martin J., Garcia Garrido J.M., Garcia Romero I., Ocampo J.A. (2004). Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology*. 26, 149-156.
- Sayadi S., Zorgani F., Ellouz R. (1996). Decolorization of olive mill waste waters by free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 3, 265-276.
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*. 35, 725-735.
- Papadimitriou E.K., Chatjipa I., Balis C. (1997). Application of composting to olive mill wastewater treatment. *Environmental Technology*. 18, 101-107.



- Tabet D., Saidi M., Houari M., Pichat P., Khalaf H. (2006). Fe-pillared clay as a Fenton-type heterogeneous catalyst for cinnamic acid degradation. *Journal of Environmental Management*. 80, 342-346.
- Walali Loudiyi D., Chimi H., Loussert R., Mahou A., Boulouha A. (1984). Caractères morphologiques et physiologiques de clones d'olive « picholine marocaine ». *Olivae*. 3, 26-31.
- Yesilada O., Sik S., Sam M. (1998). Biodegradation of olive oil mill waste-waters by *Coriolus versicolor* and *Funalia troglia*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1, 37-42.
- Zenjari B., Hafidi M., El Hadrami I., Bailly J.R. Nejmeddine A. (1999). Traitement aérobie des effluents d'huilerie par les micro-organismes du sol. *Agrochimica*. XLIII, 34-43.
- Zenjari I. (2000). Etude écotoxicologique des effluents liquides des huileries de la ville de Marrakech, impact sur les milieux récepteurs et détoxification. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Semlalia, université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc. 149 p.
- Zenjari B., El Hajjouji H., Ait Baddi G., Bailly J.R., Revel J.C., Nejmeddine A., Hafidi M. (2006). Reduction of toxic compounds during the composting of olive mill wastewater-straw mixture. *Journal of Hazardous Materials*. A138, 433-437.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **Partie I.**

## **I. Caractérisation des effluents d'huileries d'olive au cours du traitement biologique. Approches physico-chimiques et spectroscopiques.**

Cette partie se compose de trois chapitres :

### **Chapitre 1 : Publication 1**

**EL HAJJOUJI H**, AIT BADDI G, YAACOUBI A, HAMDI H, WINTERTON P, REVEL J.-C, HAFIDI M. Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater. **Bioresources Technology** (in press).

### **Chapitres 2: Publication 2**

**EL HAJJOUJI H**, BAILLY J.-R, WINTERTON P, MERLINA G, REVEL J.-C, HAFIDI M. Chemical and spectroscopic analysis of olive mill waste water during a biological treatment. **Bioresources Technology** (in press).

### **Chapitres 3: Publication 3**

**EL HAJJOUJI H**, MERLINA G, PINELLI E, WINTERTON P, REVEL J.-C, HAFIDI M. <sup>13</sup>C-NMR study of the effect of aerobic treatment of olive mill wastewater (OMW) on its lipid-free content. **Journal of Hazardous Materiel** (in press).

## Chapitre 1.

# Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater

H. EL HAJJOUJI <sup>a,e</sup>, G. AIT BADDI <sup>a</sup>, A. YAACOUBI <sup>b</sup>, H. HAMDI <sup>c</sup>, P. WINTERTON <sup>d</sup>,  
J.C. REVEL <sup>e</sup>, M. HAFIDI <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Equipe d'Ecologie Végétale, Sol et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP 2390, Marrakech, Morocco.

<sup>b</sup> Equipe Environnement et Méthodologie (LCOA), Département de Chimie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP 2390, Marrakech, Morocco.

<sup>c</sup> Département de Physique, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco.

<sup>d</sup> Université Paul Sabatier, Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

<sup>e</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, EcoLab, UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopôle – BP 32607, Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France.

**\* Corresponding author: hafidi@ucam.ac.ma**

## **Présentation**

Le traitement des effluents d'huileries d'olive par un bioprocédé aérobie a été effectué selon la méthodologie de la recherche expérimentale à l'aide du logiciel NEMRODW, en combinant l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer le traitement (température, aération, neutralisation du pH et rapport C/N).

L'évolution des caractéristiques physico-chimiques au cours de la première série de traitements (16 expériences) montre que le temps de séchage des effluents varie en fonction de la température. Le rapport C/N et les polyphénols diminuent au cours des 16 traitements, avec un abattement qui a atteint 94 % pour l'un d'eux. On constate qu'à une température de 25°C et sans aération, le séchage est défavorisé. Aussi, à un rapport C/N qui tend vers une valeur de 30 et à une température de 25°C, on observe une augmentation du pH et une réduction importante des polyphénols.

Dans un deuxième temps, la dimension du modèle est réduite, comparée à celle de la première expérience (6 expériences au lieu de 16). Ce deuxième essai consiste en une étude plus fine où les paramètres température et aération sont fixés à leur valeur optimale. On fait alors varier les paramètres pH et rapport C/N. Les résultats des analyses physico-chimiques montrent une augmentation du pH dans le cas des traitements à pH neutralisé. Il s'est produit également une réduction du rapport C/N et des polyphénols pour les six expériences, avec un abattement qui atteint 76% dans le cas du 4<sup>ème</sup> traitement (où le pH est neutralisé avec la chaux et le rapport C/N ajusté avec du nitrate d'ammonium). L'étude graphique des effets des réponses (pH, C/N et polyphénols) montre que le pH est influencé par sa valeur initiale et par le rapport C/N. Ainsi, l'ajustement du rapport C/N avec l'urée et du pH avec la soude permet une meilleure évolution de ce dernier. Quant au rapport C/N, il diminue davantage lorsque le pH est ajusté avec de la soude. Sans modification du pH initial, quelle que soit la source d'azote ajoutée pour modifier le rapport C/N, l'évolution de ce dernier est la même. L'abattement des polyphénols dépend des 2 facteurs : le pH et le rapport C/N initiaux.

Par conséquent, cette étude montre que parmi les différents paramètres choisis, l'aération, le pH et le rapport C/N, représentent les facteurs les plus importants qu'il faut optimiser pour le traitement des effluents d'huileries d'olive par ce type de procédé.

**Abstract**

The aim of the present paper was to optimise the conditions of aerobic treatment of olive mill wastewater. To do so, the waste was treated following the experimental optimal design methodology studying the set of factors susceptible to influence the treatment (pH, C/N ratio, aeration and temperature). The results of a first series of experiments showed a strong correlation between the reduction in the levels of polyphenols and three of the parameters studied, i.e. the C/N ratio, aeration and temperature. Optimised conditions led to a 94% drop in polyphenols.

Then, for a finer study of the conditions, just two parameters were varied, the pH and the C/N ratio. The results showed that the conditions of pH modification (addition of lime or sodium hydroxide) and the C/N ratio (urea or ammonium nitrate) allowed the microbiological activity to be very significantly improved. This led to polyphenol reductions of 51 and 76%.

**Keywords:** Olive mill wastewater, optimisation, aerobic bioprocess, physical-chemical characteristics, experimental design methodology.

## **1. Introduction**

The liquid effluent from olive presses, left after removal of the olive oil, causes a serious environmental hazard in olive producing countries, especially around the Mediterranean basin. It has been estimated that  $30.10^6 \text{ m}^3$  are produced per year (Merchichi and Sayadi, 2005). The problems mainly arise from the effluent's high level of pollutants leading to a high chemical oxygen demand ( $>200\text{g/L}$ ) (Della Greca et al., 2004; Skerratt and Ammar, 1999). In particular, the pollutants include carbohydrates, proteins, and lipids but mono and polyaromatic compounds such as polyphenols are also present (Borja et al., 2005). The polyphenols, which are refractory to biodegradation, are the principal cause of the toxicity of the effluent (D'Annibale et al., 2006; Di Gioia et al., 2001; El Alami, 2000; El Hajjouji et al., 2007a; Merchichi and Sayadi, 2005). However, pollution from mill waste is closely related to the extraction system used. Effluent production is minimal in mills that extract the olive oil by pressing, compared to systems that use extraction by centrifugation: Raggi et al. (2000) reported 40% effluent for the presses and 95% effluent for centrifugation. Accordingly, Skerratt and Ammar (1999) reported that pressing 100 kg of olives in continuous extraction processes, such as those used in modern mills, produces 20 litres of olive oil and 70 to 150 litres of liquid effluent. The effluent from traditional presses is more concentrated, containing a larger proportion of organic matter than the effluent from modern mills. In Morocco the problem becomes particularly significant, olive mills being amongst the greatest sources of industrial pollution (El Hajjouji et al., 2007b; Zenjari et al., 1999, 2006). The extraction is generally by press in the traditional units while the modern plants are based on three-phase centrifugation (Ait Baddi et al., 2003a; Fakharedine et al., 2006; Hafidi et al., 2004). In Morocco, the effluent produced by the plants in one season of harvest is estimated at  $250\,000 \text{ m}^3$  (IOM, 2003/2004). With a view to protecting surface and underground water, several types of physical, chemical and biological processes have been proposed to treat the effluent (Balis et al., 1996; Carmona et al., 2000; Fountoulakis et al., 2002; Mantzavinos and Kalogerakis, 2005). But, owing to the high cost of the treatments on an industrial scale, few have actually been applied in commercial olive mills. However, the richness of the effluent in terms of fertilizing elements and organic matter could favour its use as a soil amendment in particular in Morocco where the soils are poor in organic matter and very liable to erosion. However, the agronomic quality and hence the economic value of the final product are directly dependent on the degree of maturity reached during treatment.



To determine the parameters affecting the quality of the final product, with the intention to optimise the process during further work, the set of factors influencing the treatment of the effluent was studied. A full factorial matrix was established and processing the results with the Nemrodw software (New Efficient Methodology for Research using Optimal Design) enabled us to quantify the direct effects and interactions of the various factors on the responses chosen and to identify those that will require fine-tuning during the optimisation phase.

## **2. Methods**

### ***2.1. Origin and physical-chemical characteristics of the olive mill wastewater***

The wastewater was taken from a modern three-phase centrifugation olive mill in Marrakech, Morocco. The wastewater samples were taken at different places in the storage lagoon and a homogeneous and representative sample was taken to the laboratory and stored at 4°C for subsequent experimentation and physico-chemical analyses. The wastewater was homogenised before experiments.

The pH was measured at ambient temperature following the recommendations of Rodier (1971). The total organic carbon (TOC) and the Kjeldahl total nitrogen (KTN) were determined according to AFNOR standard AFNOR T90-110 (1975). Total polyphenols were extracted and purified in ethyl acetate using the method of Macheix et al. (1990) and assayed according to Folin-Ciocalteu (Vazquez et al., 1974).

### ***2.2. Experimental methodology***

#### ***2.2.1 First experiment***

The series of aerobic treatments of the olive mill wastewater were carried out in glass crystallising dishes. The volume of effluent used was 2L/dish. A constant air flow ensured sufficient oxygenation of the mixture by bubbling (Fakharedine et al., 2006). The various treatments were either carried out maintaining the pH at 6 or leaving it at its initial value. Likewise, the C/N ratio was held at between 30 and 65. In addition, all the treatments were carried out in the presence or the absence of aeration and at ambient temperature or at 40°C. The effluent used in the study was not inoculated, the microorganisms naturally present in the wastewater, especially yeasts, being responsible for its biodegradation. The corresponding experimental design is reported in table 1.

**Table 1.** Experimental design obtained from the full  $2^4$  factorial experiment matrix

| Exp. N° | pH   | C/N | Aeration | Temperature (°C) |
|---------|------|-----|----------|------------------|
| 1       | 4.88 | 31  | Without  | 25               |
| 2       | 5.83 | 28  | Without  | 25               |
| 3       | 4.88 | 57  | Without  | 25               |
| 4       | 5.80 | 55  | Without  | 25               |
| 5       | 4.88 | 40  | With     | 25               |
| 6       | 5.84 | 40  | With     | 25               |
| 7       | 4.88 | 65  | With     | 25               |
| 8       | 5.99 | 59  | With     | 25               |
| 9       | 4.88 | 34  | Without  | 40               |
| 10      | 5.88 | 36  | Without  | 40               |
| 11      | 4.88 | 53  | Without  | 40               |
| 12      | 5.88 | 55  | Without  | 40               |
| 13      | 4.88 | 31  | With     | 40               |
| 14      | 5.90 | 29  | With     | 40               |
| 15      | 4.88 | 51  | With     | 40               |
| 16      | 5.83 | 52  | With     | 40               |

The factors chosen for study were the pH, the C/N ratio, aeration and temperature. This choice was determined by the relative importance of these factors and their influence on the activity of the microorganisms. It is the activity of the microorganisms that enhances the degradation of the phenolic fraction, which is the part that makes this effluent toxic. After establishing the experimental matrices and experimental design, the results were processed using Nemrodw software (Mathieu et al., 2000). Inspiration was drawn from the works of Ahmad et al. (2005), Alinsafi et al. (2005) and Baçaoui et al. (2002). The first series of

experiments was carried out to experimentally determine the most influent of the factors studied, then, in the second stage, the optimum experimental response was fine-tuned.

The experimental responses followed here were the drying time, the pH, the C/N ratio and the drop in polyphenols.

### 2.2.2 Second experiment

For these tests the olive mill wastewater was also placed in glass crystallising dishes under various physical-chemical conditions. Among the four factors studied above, two were varied here: the C/N ratio was adjusted by addition of urea or of ammonium nitrate and the pH was either kept at its initial value or neutralised by addition of lime or sodium hydroxide. Aeration was maintained permanently and the temperature stabilised at the ambient value of 25°C. Consequently 6 tests were performed following the experimental design detailed in table 2.

**Table 2.** Experimental design corresponding to the asymmetrical factorial experiment matrix  $2^{13^{1//6}}$  and the initial values of the C/N ratio and the pH.

| Exp. N° | C/N              |        | pH               |        |
|---------|------------------|--------|------------------|--------|
|         | Addition         | Values | Addition         | Values |
| 1       | Urea             | 45.7   | None             | 4.94   |
| 2       | Ammonium nitrate | 50.5   | None             | 4.85   |
| 3       | Urea             | 48.1   | Lime             | 6.18   |
| 4       | Ammonium nitrate | 48.1   | Lime             | 6.18   |
| 5       | Urea             | 43.1   | Sodium hydroxide | 6.74   |
| 6       | Ammonium nitrate | 53.8   | Sodium hydroxide | 6.48   |

The experimental responses determined during the second experiment were related to the pH, the C/N ratio and the drop in polyphenols.

## 3. Results and discussion

### 3.1. First series of experiments

The responses noted for the 16 experiments (drying time, pH, C/N, drop in polyphenols) are presented in table 3.

**Table 3.** Experimental responses obtained during the 16 treatments of the first series of experiments.

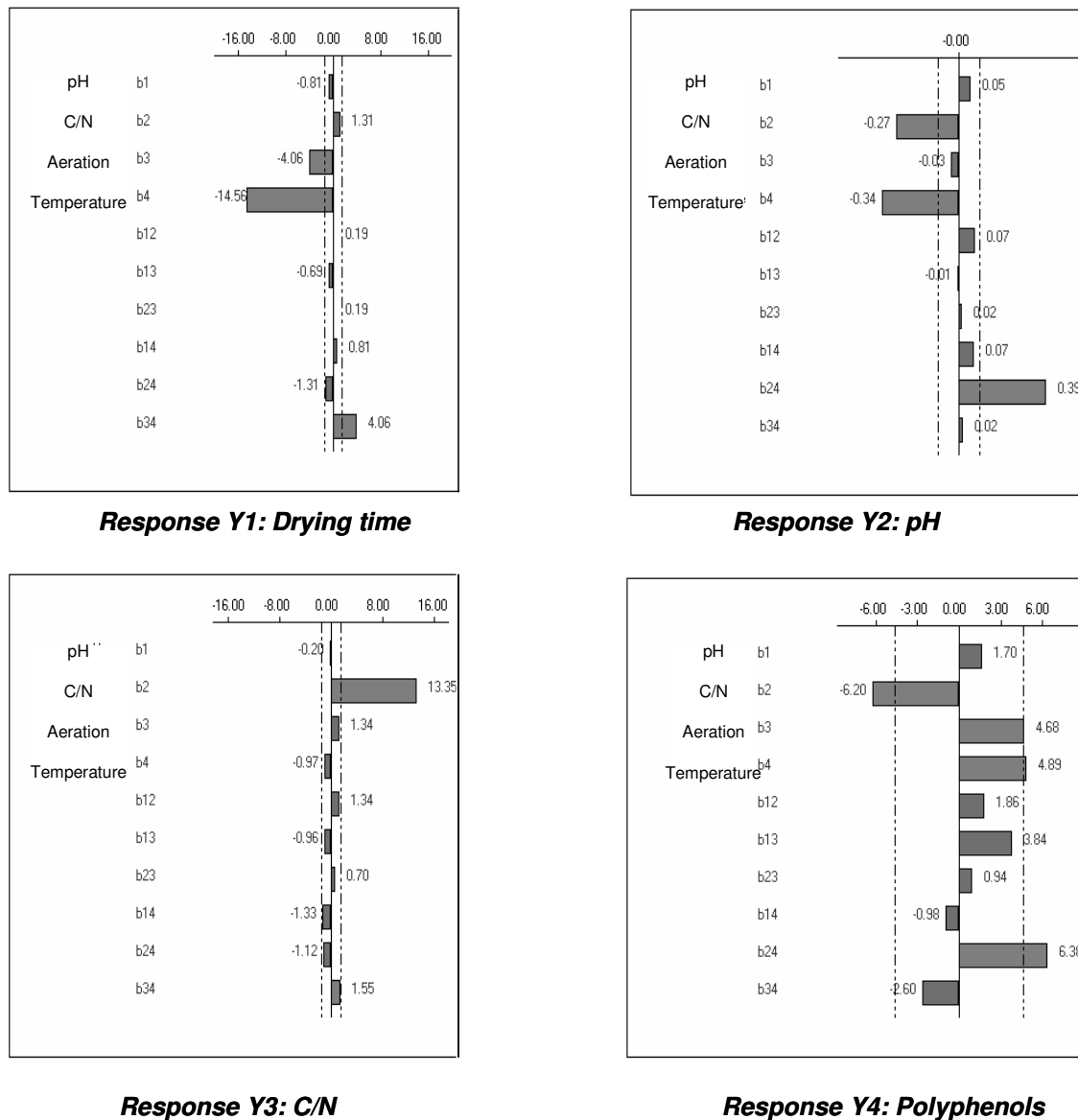
| Exp. N° | Drying time (days) | pH   | C/N   | Drop in polyphenols (%) |
|---------|--------------------|------|-------|-------------------------|
| 1       | 41                 | 7.07 | 28.89 | 71.89                   |
| 2       | 43                 | 6.95 | 27.15 | 81.50                   |
| 3       | 48                 | 5.45 | 53.10 | 53.26                   |
| 4       | 45                 | 5.69 | 58.72 | 36.82                   |
| 5       | 30                 | 7.00 | 27.42 | 87.89                   |
| 6       | 20                 | 6.57 | 28.15 | 89.92                   |
| 7       | 32                 | 5.47 | 55.55 | 60.28                   |
| 8       | 30                 | 5.68 | 56.64 | 94.13                   |
| 9       | 7                  | 5.38 | 29.02 | 89.74                   |
| 10      | 7                  | 5.49 | 24.55 | 90.55                   |
| 11      | 7                  | 5.58 | 46.15 | 88.72                   |
| 12      | 7                  | 5.84 | 50.39 | 90.63                   |
| 13      | 7                  | 5.30 | 32.99 | 93.38                   |
| 14      | 7                  | 5.61 | 26.20 | 93.48                   |
| 15      | 7                  | 5.49 | 56.88 | 93.04                   |
| 16      | 7                  | 5.78 | 54.45 | 92.79                   |

It can be seen that the time taken for the wastewater to dry is dependent on the treatment received. For the last 8 treatments, drying only required 7 days. This can be attributed to the high temperatures (40°C) maintained during these experiments. For the others, the effluent took from 20 to 48 days to dry. In the same way, Ait Baddi (2005) attributed the maintenance of high temperature during composting to the effect of aeration. They explained that these two factors are of crucial importance for microbial degradation to occur correctly. Likewise, during the composting, the increase in temperature causes a change in the physical-chemical

characteristics of the final product. Indeed, the plots of the C/N ratio versus time showed a reduction of C/N during the different treatments following intense microbiological activity indicating good stabilisation of the effluent after treatment (El Hajjouji et al., 2007b). Moreover, except in treatments 3 and 4, the level of polyphenols showed a strong reduction, especially in treatment 8 where it fell by 94%. So, with aeration and at 25°C, the level of polyphenols was greatly reduced. This result can be compared to those of Fakharedine et al. (2006) who found that for olive mill wastewater at an acid pH, treated with an aerobic bioprocess using soil microorganisms, polyphenols were reduced by 90%. Such high levels of degradation could be due to the effect of aeration. Indeed, El Hajjouji et al. (2007c) attributed the fall in the level of total polyphenols, during the treatment of olive mill wastewater, to their polymerisation. According to Casa et al. (2003), the enzyme laccase acts on the polyphenols by shifting one electron from the hydroxyl group, the oxidative action of laccase on the polyphenols then results in the formation of oligomers and polymers of the humic type. This conversion of simpler phenols into larger polymers reduces their ability to be assimilated and their phytotoxicity.

Consequently, these results could be explained by the way the decomposition of the organic matter progresses: it starts with the hydrolysis of proteins, urea and hemicellulose releasing soluble ammonia, amino acids, sugars and aliphatic acids. As the decomposition progresses, lignin and cellulose are degraded. The sugars, aliphatic compounds and certain polyphenols are used, with ammonia, to synthesise the microbiological biomass. In the presence of the secondary metabolites of the decomposing organisms, some polyphenolic compounds can start auto-oxidation or be oxidised enzymatically, and condense to form humic substances (Ait Baddi et al, 2004).

To establish a model that can explain the influence of optimal conditions on the quality of the final product, a graphic study of the response to the various factors (drying time, pH, C/N ratio, drop in polyphenols) was carried out using the Nemrodw software (Fig. 1). It was found that the drying time presented a strong negative correlation with aeration and temperature (Fig. 1, response Y1). The interaction of the drying time with these two factors shows that at 25°C and without aeration, drying is diminished. It can also be seen that the pH (Fig. 1, response Y2) is negatively correlated with the temperature and the C/N ratio. The study of its interaction with these two parameters shows that at 25°C and for a C/N ratio of 30, the pH is compatible with the digestion of the effluent.



**Fig. 1.** Graphic study of the effects of the responses to the drying time, the pH, the C/N ratio and the drop in polyphenols.

Bari et al. (2000) and Zenjari et al. (2006) reported that ideally, for optimal microbiological activity, the C/N ratio should have a value of 30. These authors explained that a C/N ratio under 30 leads to excessive losses of nitrogen and if it is above this value, the microbiological activity is slowed down through lack of available nitrogen. In the present study, the C/N ratio of the final product showed a strong correlation with its initial value (Fig. 1, response Y3).

Concerning polyphenols, their level was strongly correlated to the C/N ratio, aeration and temperature (Fig. 1, response Y4). At 25°C and with a C/N ratio of 30, the level of

polyphenols was greatly reduced. Fakharedine et al. (2006) reported the same result for similar olive mill wastewater treated aerobically, using correlation analysis carried out with the SPSS software. They also reported a strong correlation between the C/N ratio and the level of remaining polyphenols. Again, similar results were reported by Zenjari et al. (2006) showing a strong correlation between the degradation of organic matter and that of the polyphenols during the aerobic treatment of olive water by soil microorganisms. This was further confirmed by the works of Ait Baddi et al. (2003b) on the polyphenol fraction of olive mill waste.

Consequently, the graphic study of the response to the various factors used, by means of the Nemrodw software, confirmed the results obtained in the preliminary study, which was based on various physical-chemical analyses.

The methodological tool used enabled the development of a successful model that gave a good representation of the phenomenon studied over the relevant experimental range and the determination of the main effects and interactions of the various factors on the responses studied. This approach has been used in many studies covering several domains (Ahmad et al., 2005; Alinsafi et al., 2005; Baçaoui et al., 2002). To fine-tune the results obtained, a second experiment was carried out to study the optimisation of the factors investigated (C/N ratio and pH) and to quantify the effects of various products used to adjust the C/N ratio (urea, ammonium nitrate) and to raise the pH to neutral (with sodium hydroxide, lime or without any additives).

### 3.2. Second series of experiments

The results of the responses (pH, C/N, drop in polyphenols) to the 6 treatments are reported in table 4. Overall, the results showed a rise in the pH in the final stages of the first two experiments. Similar results were reported by Hafidi et al. (2004) and Fakharedine et al. (2006) when studying the aerobic treatment of olive water. They attributed the rise in pH to the release of ammonium nitrogen during the decomposition of proteinaceous material and/or the degradation of a number of molecules bearing  $-\text{COOH}$  or  $-\text{OH}$  groups. For the last four experiments, a reduction of the pH was noted in the final stages of the treatments; this could be caused by the intense microbiological activity generating secondary metabolites, in particular organic acids, which make a significant contribution to lowering the pH (Ouabbi, 1999). Among these metabolites, since the reactions occur in aerobic conditions, are carbonates and bicarbonates which, like  $-\text{COOH}$ , can bind the  $\text{Ca}^{2+}$  contained in the lime added for treatments 3 and 4 (El Hajjouji et al., 2007c).

**Table 4.** Experimental responses obtained for the second series of experiments.

| N°. Exp. | pH   | C/N   | Drop in polyphenols (%) |
|----------|------|-------|-------------------------|
| 1        | 5.41 | 37.34 | 61.54                   |
| 2        | 5.39 | 35.86 | 50.63                   |
| 3        | 5.71 | 26.92 | 63.38                   |
| 4        | 5.69 | 27.03 | 75.85                   |
| 5        | 6.26 | 31.75 | 72.65                   |
| 6        | 6.04 | 34.63 | 72.91                   |

Concerning the C/N ratio, a decrease was noted during all 6 treatments following the decomposition of the organic matter by the microorganisms using the carbon as an energy source (Ait Baddi, 2005; El Hajjouji et al., 2007c). Similarly, the levels of polyphenols were strongly reduced during the various treatments, reaching a drop of 76% with treatment 4. The addition of a readily bioavailable form of nitrogen favoured microbial activity and hence the degradation of phenols and also of other compounds (El Hajjouji et al., 2007c). Note that for the last four treatments, where the pH had been neutralised, polyphenol levels dropped the most. Similar results are reported by El Hajjouji et al. (2007c). These results are also correlated to those of Hafidi et al. (2004) and Fakharedine et al. (2006) who showed that neutralisation of wastewater by addition of rock phosphate led to the partial transformation of phenolic compounds into phenates, reducing their antimicrobial activity and facilitating their metabolism by microorganisms.

The graphic study of the effects of the responses (pH, C/N, drop in polyphenols) indicates that the pH is influenced by its initial value and by the C/N ratio. Adjusting the C/N ratio with urea and the pH with sodium hydroxide optimised the pH throughout the biodegradation. As for the C/N ratio, it underwent favourable modifications at initial pH irrespective of nitrogenous molecule supplementation and for the pair: sodium hydroxide + ammonium nitrate. However, the decrease in polyphenols was very efficient using ammonium nitrate to correct the initial C/N value, and with a pH neutralised with either sodium hydroxide or lime and for the pair: urea + NaOH.



Consequently, this study revealed that:

- The treatment of the olive mill wastewater using an aerobic bioprocess could enable the efficient degradation of toxic compounds, in particular polyphenols, improving the attractiveness of the final product as soil amendment.
- The type of chemical added to adjust the C/N ratio and the pH can have a great influence on the efficacy of the treatment. Thus, at ambient temperature and with aeration, the combinations: (ammonium nitrate + lime or sodium hydroxide) and (urea + sodium hydroxide) gave satisfactory results for the three responses studied. The choice of the combination to be used will be partly governed by the cost of the reagents and also by the final use intended for the residue (assimilation of the nitrogen by plants).

To our knowledge, the literature has never reported the application of optimised experimental design to the treatment of olive-mill wastewater. It enabled us to reduce the number of experiments during the optimisation of the process. The final product of the optimised process showed very strong reductions of polyphenols with respect to the results found in the literature.

#### **4. Conclusion**

The treatment of olive-mill wastewater by aerobic degradation using optimisation by experimental design, allowed us to determine the optimal conditions of treatment. Optimisation of pH (with lime or sodium hydroxide) and of the C/N ratio (urea or ammonium nitrate) improved microbial activity very significantly. This led to reductions in the levels of polyphenols of 51 and 76%. The lowering of the levels of polyphenols, which are the direct cause of the toxicity of the olive mill effluent, is the result of their metabolism by microorganisms (enhanced on neutralisation of the pH) and/or their participation in the formation of humic substances, which play an essential role in enabling the soil-plant system to function correctly.

#### **Acknowledgements**

This work was financially supported in part by an Eiffel grant from the French government.

## References

- AFNOR., 1975. Norme T90-1110. Essai des eaux : dosage de l'azote total Kjeldahl.
- Ahmad, A.L., Ismail, S., Bhatia, S., 2005. Optimization of coagulation-flocculation process for palm oil mill effluent using response surface methodology. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2828-2834.
- Ait Baddi, G., 2005. Contribution à la valorisation des déchets d'huileries d'olive par compostage : Approche physico-chimique, spectroscopique et bilan humique du compost. PhD thesis, University of Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco.
- Ait Baddi, G., Hafidi, M., Gilard, V., Revel, J.C., 2003a. Characterization of humic acids produced during composting of olive mill wastes: elemental and spectroscopic analyses (FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR). *Agronomie*. 23, 661-666.
- Ait Baddi, G., Hafidi, M., Merlina, G., Revel, J.C., 2003b. Caractérisation et identification des polyphénols lors du traitement des déchets d'huileries d'olives par compostage. *Agrochimica*. XLVII, 5-6, 161-172.
- Ait Baddi, G., Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., Cegarra, J., Hafidi, M., 2004. Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 54, 39-44.
- Alinsafi, A., Khemis, M., Pons, M.N., Leclerc, J.P., Yaacoubi, A., Benhammou, A., Nejmeddine, A., 2005. Electro-coagulation of reactive textile dyes and textiles wastewater. *Chem. Engin. Processing*. 44, 461-470.
- Baçaoui, A., Dahbi, A., Yaacoubi, A., Bennouna, C., Maldonado Hodar, F.J., Rivera Utrilla, J., Carrasco Marin, F., Moreno Castilla, C., 2002. Experimental design to optimize preparation of activated carbons for use in water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3844-3849.
- Balis, C., Chatzipavlidis, J., Flouri, F., 1996. Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 38, 169-78.
- Bari, Q.H., Koenig, A., Guihe, T., 2000. Kinetic analysis of forced aeration composting. I. Reaction rates and temperature. *Waste Manage. Res.* 18, 303-312.
- Borja, R., Sánchez, E., Rincón, B., Raposo, F., Martín, M.A., Martín, A., 2005. Study and optimisation of the anaerobic acidogenic fermentation of two-phase olive pomace. *Process Biochem.* 40, 281-291.

- Carmona, R., Ubedo, J., Briones, A., 2000. Emploi biotechnologique des sous-produits de l'élaboration de l'huile d'olive. *Olivae*. Vol. 83, pp 32-36.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Giovannozzi, S., Lo Cascio, B., 2003. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*. 50 959-66.
- D'Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F., Petruccioli, M., 2006. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresour. Technol.* 97, 1828-1833.
- Della Greca, M., Previtera, L., Temussi, F., Zarrelli, A., 2004. Low-molecular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochem. Anal.* S15, 184-188
- Di Gioia, D., Fava, F., Bertin, L., Marchetti, L., 2001. Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of monocyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 619-626.
- El Alami, B., 2000. Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. Report, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Morocco.
- El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guisresse, M., Merlina, G., Revel, J.C., Hafidi, M., 2007a. Assesment of the genotoxicity of olive mill waste wate (OMWW) with the *Vicia Faba* micronucleus test. *Mutat. Res.* 634, 25-31.
- El Hajjouji, H., Fakharedine, N., Ait Baddi, G., Winterton, P., Bailly, J.R., Revel, J.C., Hafidi, M., 2007b. Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* 98, 3513-3520.
- El Hajjouji, H., Bailly, J.R., Winterton, P., Merlina, G., Revel, J.C., Hafidi, M., 2007c. Chemical and spectroscopic analysis of olive mill wastewater during a biological treatment.. *Bioresour. Technol.* (in press).
- Fakharedine, N., El Hajjouji, H., Ait Baddi, G., Revel, J.C., Hafidi, M., 2006. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during aerobic digestion of olive-mill waste-waters. *Process Biochem.* 41,398-404.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G., Lyberatos, G., 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 36, 4735-44.

- Hafidi, M., Ait Baddi, G., Chetoui, A., 2004. Traitement des effluents liquides d'huileries d'olives par des micro-organismes et suivi du devenir des polyphénols. *Agrochimica*. XLVIII, 1-2, 1-12.
- IOM., 2003/2004. Industrie oléicole au Maroc et son impact sur l'environnement : Propositions d'actions de lutte contre la pollution générée par les huileries d'olives, cas de la province de Taounate, 15p.
- Macheix, J.J., Fleuriot, A., Billot, J.A., 1990. Fruit phenolics, CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, USA, 378 p.
- Mantzavinos, D., Kalogerakis, N., 2005. Treatment of olive mill effluent Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes- an overview. *Environ. Int.* 1, 289-295.
- Mathieu, D., Mony, J., Phan Tan Luu, R., 2000. Logiciel de génération des matrices d'expériences en fonction des objectifs et traitement des réponses expérimentales, LPRAI, Marseille, France.
- Merchichi, T., Sayadi, S., 2005. Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochem.* 40, 139-145.
- Ouabbi, M., 1999. Diagnostic de la consommation d'eau dans une unité de trituration des olives et traitement de ses margines. University report. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Morocco.
- Raggi, A., Cichelli, A., Pagliuca, G., Costantino, A., 2000. A screening LCA of olive husk combustion for residential heating. *In: Proceedings of the First World Conference on Biomass Energy and Industry*, Seville, pp. 1001-1004.
- Rodier, J., 1971. L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau. Ed. Dunod, Paris.
- Skerratt, G., Ammar, E., 1999. The application of reedbed treatment technology to the treatment of effluents from olive oil mills. Project report, Centre for Environmental Technology, Staffordshire University, UK, 29p.
- Vazquez Roncero, A., Graciani Constante, E., Maestro Duran, R., 1974. Componentes fenolicos de la aceituna. I- polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites*. 25, 269-279.
- Zenjari, B., Hafidi, M., El Hadrami, I., Bailly, J.R., Nejmeddine, A., 1999. Traitement aérobie des effluents d'huileries par les micro-organismes du sol. *Agrochimica*. 43 Vol. XLIII n°5-6 277-286.

Zenjari, B., El Hajjouji, H., Ait Baddi, G., Bailly, J.R., Revel, J.C., Nejmeddine, A., Hafidi, M., 2006. Reduction of toxic compounds during the composting of olive mill wastewater-straw mixture. J. Hazard. Mat. A138, 433-437.

## Chapitre 2.

### Chemical and spectroscopic analysis of olive mill waste water during a biological treatment

H. EL HAJJOUJI <sup>a,b</sup>, J.R. BAILLY <sup>b</sup>, P. WINTERTON <sup>c</sup>, G. MERLINA <sup>b</sup>, J.C. REVEL <sup>b</sup>,  
M. HAFIDI <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Equipe d'Ecologie Végétale, Sol et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP 2390, Marrakech, Morocco.

<sup>b</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, EcoLab, UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopôle – BP 32607, Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France.

<sup>c</sup> Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne 31062 Toulouse cedex, France.

**\* Corresponding author: hafidi@ucam.ac.ma**

## Présentation

Le traitement des effluents d'huileries d'olive par un bioprocédé aérobie a été effectué à l'échelle du laboratoire pendant 45 jours, en combinant l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer les traitements réalisés (température, aération, pH et rapport C/N). Les résultats des analyses physico-chimiques montrent des produits à pH de 5.39 et 5.69 respectivement pour les traitements 1 (sans chaux) et 2 (avec chaux), ce qui correspondrait à la « stabilisation » des produits en fin des traitements. L'ajout de nitrate d'ammonium a favorisé l'activité microbienne et par conséquent la dégradation de la matière organique. La neutralisation du pH par ajout de la chaux (traitement 2) a un effet positif sur la dégradation des phénols, avec un abattement de l'ordre de 76%. On note un changement de la structure de la matière organique, ce qui est bien visible sur les spectres infrarouges.

La confrontation entre analyses élémentaires, IRTF et  $^{13}\text{C}$ -RMN montre qu'au cours du traitement 2, les groupements aliphatiques (des molécules lipidiques et peptidiques) diminuent probablement suite à leur utilisation comme source d'énergie par les populations microbiennes. En parallèle, les structures aromatiques sont substituées par des groupements phénoliques, méthoxyliques et carboxyliques, ces derniers diminuent en fonction du temps ce qui indique une polymérisation de la matière organique. En effet, la biotransformation des effluents d'huileries d'olive semble être favorable à la stabilisation de la matière organique par les mécanismes de transformation identiques à ceux qui produisent l'humus dans les sols, ce qui pourra ouvrir la voie à l'utilisation, sans risque, des déchets liquides d'huileries d'olive en agriculture.

**Abstract**

The treatment of olive mill waste water was studied on the laboratory scale. Physico-chemical analyses showed the final products had a mean pH of 5.4 without neutralisation and 5.7 when lime was added to the process. Raising the pH by adding lime had a positive outcome on the degradation of phenols, whose levels were reduced by over 76%. The lime also changed the structure of the organic matter, as seen in the infra-red spectra. Combining the FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data showed that with addition of lime, the density of aliphatic groups decreased to the benefit of aromatic groups, indicating that polymerisation of the organic matter occurred during the bioprocess. Under our experimental conditions, the biotransformation of olive mill waste water appears to favour the stabilisation of the organic matter through mechanisms analogous to those that lead to the formation of humus in the soil.

**Key words:** Olive mill waste water; Aerobic bioprocess; Elemental analysis; FTIR spectroscopy;  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy



## **1. Introduction**

Worldwide production of olive oil reaches about 2 million tonnes/year with almost 90% being concentrated in the countries of the Mediterranean basin (CAR/PP, 2000). The extraction of oil from the olives generates large quantities of liquid by-products (Sampedro et al., 2007). This effluent presents a high biological and chemical oxygen demand (BOD: 100 g/L and COD: 200 g/L respectively) (Della Greca et al., 2004; Dias et al., 2004; Tardioli et al., 1997) and contains large quantities of aromatic compounds, which are responsible for the effluent's phytotoxic and antibacterial effects (D'Annibale et al., 2006; El Hajjouji et al., 2007; Gonzalez et al., 1990; Procida and Ceccon, 2006). Nevertheless, the effluent also contains useful levels of fertilisers such as nitrogen and potassium and can act as a source of organic matter (Cereti et al., 2004; Zenjari et al., 1999, 2006), which could open the way for its use in agriculture.

Organic material is an essential component of soil, the very presence of organic matter is what defines a soil. It plays an essential role in various soil properties: holding water, buffering the pH, binding ions with varying degrees of reversibility, complexing ions, structuring the soil, and it is the combination of all these properties that finally determines the fertility of the soil. On a global scale, organic matter actually represents a phenomenally vast carbon reservoir (Kogel Knabner, 2005). Moreover, input of organic matter in the form of composted residues, to soil poor in organic matter can help stabilise the soil's structure and limit the risks of erosion. Compost also enhances the fertility of soil owing to the presence of humic substances (Ait Baddi et al., 2003; Senesi et al., 1996) and adding humus to soils stimulates plant growth and improves yields. Chen et al. (1994) reported that the simultaneous addition of humic substances and mineral elements leads to much greater increases in yield than adding the mineral elements alone. The study of the stability of the organic matter contained in waste is an important step in choosing the most appropriate way to deal with the waste. This can be approached from several directions: following the decrease in the level of organic matter and of organic carbon, the variation of the C/N ratio, the proportions of ash, and the levels of primary metabolites such as nitrate, ammonium, and volatile fatty acids (Smidt, 2001), the microbial activity (Scaglia et al., 2000) and the absence of phytotoxicity (Epstein, 1997). The degree of humification is also used as an index of stability and to determine the agricultural value of organic residues intended for use in the amendment of arable land (Ouatmane, 2000; Senesi et al., 1996). In addition, the degree of humification provides an index of the quality of the organic matter, which depends both on the composting

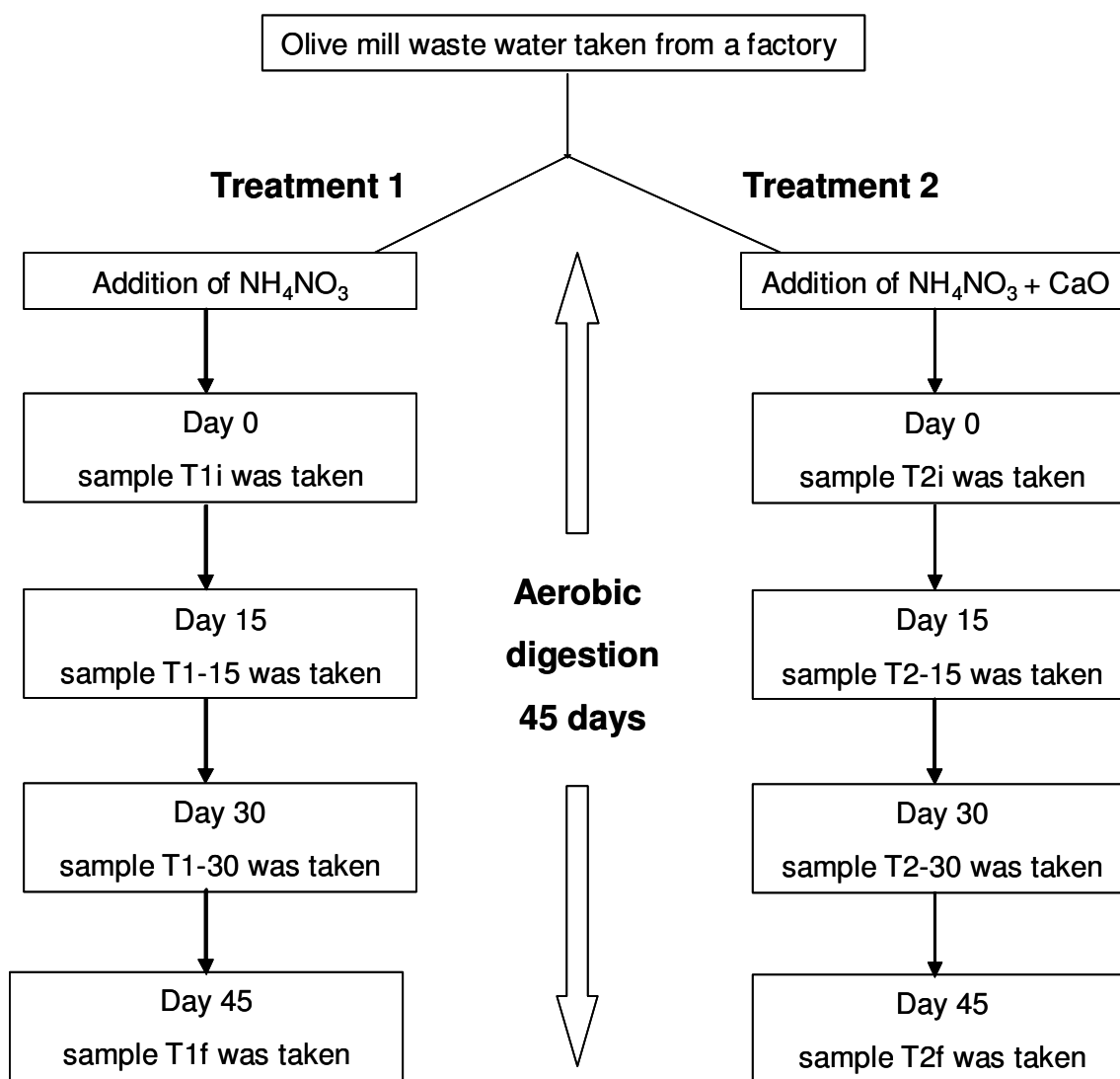
process and on the organic matrix in question (Adani et al., 1997). The aerobic treatment of olive mill waste appears to be efficient at reducing the level of phenolics present (Di Gioia et al., 2001; Fakharedine et al., 2006; Zenjari et al., 2006). This reduction can be explained by the use of the phenols as an energy source by micro-organisms (Paredes et al., 2002; Hafidi et al., 2004; Zenjari et al., 1999), and their incorporation during the neoformation of humic substances (Hafidi et al., 2004, 2005; Zenjari et al., 1999). Each step in the decomposition of organic matter is characterised by the production of metabolites: IR spectroscopy can be used to provide useful information on the functional groups in these metabolites (Smidt and Meissl, 2006). Infra-red spectroscopy has been used by various authors to determine the maturity of composts (Ouatmane et al., 2000) and to characterise the humic substances occurring in the composts (Amir et al., 2004; Ouatmane et al., 2000; Sanchez Monedero et al., 2002).  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy has also been used to determine the chemical environment of the carbons (Ait Baddi et al., 2004; Amir et al., 2004; Castaldi et al., 2005; Hafidi et al., 2005).

The present study consists in following the changes that occur in a liquid effluent in aerobic conditions after improving the supply of nitrogen available to the microorganisms and bringing the pH up to values more favourable to their growth. In these experimental conditions, the changes in the organic matter were followed by a combination of complementary techniques (elemental analysis, infra-red spectroscopy, and  $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance) to determine the degree of stability of the organic matter in the effluent.

## **2. Methods**

### ***2.1. The samples and the treatments***

Liquid effluent was taken from a modern 3-phase centrifugation olive oil production unit in the Marrakech area (Morocco). It was treated by aerobic digestion (volume: 2 litres) for 45 days (figure 1). It was submitted to different treatments (T1 and T2) with three replicates for each treatment.



**Fig. 1.** Experiment scheme

For T1, ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) was added to bring the C/N ratio to 50.5, the pH was not adjusted (initial value 4.85). Treatment T2 involved bringing the C/N ratio to 48.08 with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and bringing the pH to 6.18 by addition of lime ( $\text{CaO}$ ). For both treatments, run at ambient temperature ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ), aeration was achieved by bubbling compressed air through the liquids. After homogenisation samples of the initial effluent were taken at time 0, then after 15, 30 and finally 45 days. Before studying the organic matter, samples were dialysed (Spectra Por membrane MWCO 1000 Da) to eliminate the excess salts, then freeze dried.

## **2.2. Methods of analysis**

### **2.2.1. Standard chemical analyses**

All chemical analyses were performed in triplicate and the values reported here are the means. The pH was measured at ambient temperature according to the method of Rodier (1971). The total organic carbon (TOC) was determined using Anne's method based on potassium dichromate, as described by Aubert (1978). Total Kjeldahl nitrogen (TKN) was determined using the standard French procedure AFNOR T90-110 (1975). Chemical oxygen demand (COD) was assayed by the method of Rodier (1984). Total phenols were extracted and purified with ethyl acetate, as reported in Macheix et al. (1990) and were assayed according to Folin-Ciocalteu (Vasquez Roncero et al., 1974).

### **2.2.2. Elemental analysis**

The instruments used for C, H and N were a Fison Carlo Erba EA 1110, and a Carlo Erba 1106 for O. About 1 mg (0.8 - 1.2 mg) of the sample in a capsule made of tin (assay of C, H and N) or of silver (for assaying oxygen) was burned at 920-1000°C. The quantity of each element is expressed in percent mass. Each determination was performed in duplicate.

### **2.2.3. Fourier Transform Infra-Red (FTIR) spectroscopy**

A quantity of 1.5 mg of sample was compressed under vacuum with 250 mg of KBr. The pellets obtained were analysed with a Perkin-Elmer series 1600 FTIR spectrophotometer covering a frequency range of 4000 to 400 cm<sup>-1</sup>.

### **2.2.4. <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C-NMR)**

<sup>13</sup>C-NMR spectra were obtained from ~150 mg of the freeze-dried olive mill waste water resuspended in 3 ml 0.5 M NaOD. The spectra were recorded on a Bruker WB-AM 300 spectrometer at 75.4 MHz with a 10 mm probe head. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm, relative to 3-(trimethylsilyl)-propane sulfonic acid sodium salt as external reference. To suppress nuclear Overhauser enhancement, a pulse program with inverse gated proton decoupling was used. Spectra were acquired with a repetition time between impulsions of 2.8 s, a sweep width of 16 700 Hz and a pulse width of 5  $\mu$ s (35°). 50 000-60 000 FID files were accumulated. The FIDs were treated with a 50 Hz line-broadening function. Integration of the spectra was performed with Bruker Win NMR software.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Physico-chemical characterisation of the olive mill waste water

The proportion of water present in the effluent decreased strongly during the two treatments (table 1), but remained higher in T1 (53.76%) than in T2 (20.51%). As the surface area and the temperature were the same for both treatments, the difference can be attributed to higher microbial activity: aerobic microbes developed preferentially around the air outlets, which become partly blocked, restricting the flow of air and hence the degree of evaporation.

**Table 1.** Physico-chemical characteristics of the olive mill waste water at the initial (Ti) and final stages of treatments (Tf)

| Stage | pH        | Moisture % | TOC % | TKN %     | C/N by weight | COD %  | Drop in COD % | Drop in Phenols % |
|-------|-----------|------------|-------|-----------|---------------|--------|---------------|-------------------|
| T1i   | 4.85±0.01 | 82.18±0.05 | 50    | 0.99±0.17 | 50.50         | 137.84 | -             | -                 |
| T1f   | 5.39±0.01 | 38.63±1.21 | 45    | 1.26±0.06 | 35.86         | 107.81 | 21.8          | 50.6              |
| T2i   | 6.18±0.01 | 80.93±0.20 | 50    | 1.04±0.05 | 48.08         | 104.95 | -             | -                 |
| T2f   | 5.69±0.03 | 64.33±0.20 | 35    | 1.30±0.01 | 27.03         | 99.87  | 4.8           | 75.8              |

TOC = Total Organic Carbon, TKN = Total Kjeldhal Nitrogen, COD = Chemical Oxygen Demand

With treatment 1, the pH increased with time. This could, of course, result from the release of ammonium from protein degradation but considering the behaviour of the C/N ratio this is not very likely. It is more probable that a decrease occurs in the levels of  $-\text{COO}^-$  and/or  $-\text{OH}$  due to both the microbial degradation of certain compounds (Hamdi et al., 1992) and the condensation-polymerisation reactions involving these moieties.

With treatment 2, the reverse occurred. Ouabbi (1999) explained this pattern by the stronger activity of the microorganisms producing metabolites such as organic acids, which contribute to a general acidification. Among these metabolites, since the reactions occur in aerobic conditions, are carbonates and bicarbonates which, like  $-\text{COOH}$ , can bind the  $\text{Ca}^{++}$  contained in the added lime.

The increase of the lower pH (T1) and the decrease of the higher pH (T2) suggests convergence to a final value of between 5.39 and 5.69, which was arrived at after 45 days and which corresponds to the “stabilisation” that is reached at the end of the treatments (El Hajjouji et al., 2007). The C/N ratio, which fell to 28.9% for T1 and 43.8% for T2 confirms this pattern (decrease of carbon and conservation of nitrogen), indicating that the effluent is approaching the “stabilisation” state, especially with treatment T2.

For the chemical oxygen demand (COD), comparing the initial values T1i and T2i shows a clear effect of the addition of lime on the initial material. The simple act of adding lime lowered the COD by 23.9%. This decrease was pursued during the treatment, particularly for T1 with a drop of 21.8% while the drop in T2 only reached 4.8%. The action of the lime at the initial stage degrades or modifies numerous carbon structures. Moreover, the parallel between the slight decrease in the COD during T2, the value of C/N and of the TOC suggests neoformation of compounds that are stable and thus not readily degradable (Casa et al., 2003).

Treatment 2 significantly reduced the pollutant load of the effluent in terms of phenols, with a drop that reached 75.8%. In conditions of neutral pH, phenols become transformed into phenates, lose part of their antimicrobial activity and become suitable for use as a carbon source for microbial activity (Borja et al., 1994). For treatment T1, we recorded a decrease in the C/N ratio, indicating degradation of the organic compounds. A decrease occurred in the COD and in the level of phenols: decreased by 21.8% and 50.6% respectively. The drop in C/N, COD and phenols resulted from the degradation of organic matter by the microorganisms which use the carbon as an energy source (Borja et al., 1994; Hafidi et al., 2005). The addition of a readily bioavailable form of nitrogen,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , favoured microbial activity and hence the degradation of phenols and also of other compounds.

### 3.2. *Elemental analysis*

The elemental composition of the organic material in the effluent at various stages of treatment is presented in table 2 (parts a and b). By far the main components were carbon, hydrogen and oxygen. At the end of the treatment it was found that the proportion of carbon had increased slightly for T1 and decreased for T2. The decrease can be explained by the greater microbial activity during T2, the organisms using the organic material available in the medium as a source of energy (Borja et al., 1994). This resulted in a decrease in the C/N ratio, which fell from 24.06 to 21.01 for treatment 1 and 25.90 to 21.76 for treatment 2. The drop can be explained by the release of  $\text{CO}_2$  and the humification process (Hargitai, 1994).

In contrast, the C/H ratio remained stable during both treatments. Similar results have been reported by Ait Baddi et al. (2004) for fulvic acids extracted from various organic sources. According to Ait Baddi et al. (2004) the stability of the C/H ratio is independent of the degree of maturity of the compost.

The percentage of nitrogen increased at the end of the treatments, it rose from 2.73% to 3.16% for treatment 1 and 2.39% to 2.63% for treatment 2. Piccolo et al. (1992) report that

high levels of nitrogen indicate high levels of non-humified biomolecules (polypeptides). Likewise, Ait Baddi et al. (2004) attributed the high levels to the incomplete hydrolysis of the protein fraction. In the present situation, the high levels of organic nitrogen also indicate assimilation of the added nitrogen.

The O/C ratio remained practically constant, indicating that the proportion of functional groups was almost unchanged during the treatments.

Table 2b shows that treatment 2 led to a higher level of ash than treatment 1; this is due to the initial addition of lime. At the end of treatment 2, the level of ash rose from 6.47 to 13.90%, the result of the degradation of organic matter. In contrast, after treatment 1 ash decreased following the release of ammonia or the uptake of calcium by the organic structure.

**Table 2a.** Elemental composition of the dry organic matter contained in the olive mill waste water and the atomic ratios at the various stages of treatment 1 (day 0, day 15, day 30 and day 45)

|        | Percent weight |               |                |               |       | Atomic ratio |       |      |      |
|--------|----------------|---------------|----------------|---------------|-------|--------------|-------|------|------|
|        | C              | H             | O              | N             | CHON  | Ash          | C/N   | C/H  | O/C  |
| T1-D0  | 56.21<br>±0.28 | 7.71<br>±0.18 | 27.74<br>±0.09 | 2.73<br>±0.04 | 94.39 | 5.61         | 24.06 | 0.61 | 0.37 |
| T1-D15 | 55.26<br>±0.09 | 7.22<br>±0.01 | 30.26<br>±0.19 | 2.79<br>±0.02 | 95.53 | 4.47         | 23.12 | 0.64 | 0.41 |
| T1-D30 | 56.41<br>±0.06 | 7.44<br>±0.04 | 28.82<br>±0.19 | 3.15<br>±0.01 | 95.82 | 4.18         | 20.89 | 0.63 | 0.38 |
| T1-D45 | 57.03<br>±0.21 | 7.54<br>±0.03 | 27.29<br>±0.19 | 3.16<br>±0.07 | 95.02 | 4.98         | 21.02 | 0.63 | 0.36 |

**Table 2b.** Elemental composition of the dry organic matter contained in the olive mill waste water and the atomic ratios at the various stages of treatment 2 (day 0, day 15, day 30 and day 45)

|        | Percent weight |               |                |               |       | Atomic ratio |       |      |      |
|--------|----------------|---------------|----------------|---------------|-------|--------------|-------|------|------|
|        | C              | H             | O              | N             | CHON  | Ash          | C/N   | C/H  | O/C  |
| T2-D0  | 53.16<br>±0.14 | 7.41<br>±0.12 | 30.57<br>±0.05 | 2.39<br>±0.18 | 93.53 | 6.47         | 25.90 | 0.60 | 0.43 |
| T2-D15 | 53.44<br>±0.19 | 6.97<br>±0.19 | 29.75<br>±0.17 | 2.83<br>±0.07 | 92.99 | 7.01         | 22.00 | 0.64 | 0.42 |
| T2-D30 | 53.10<br>±0.23 | 6.95<br>±0.04 | 28.98<br>±0.19 | 3.03<br>±0.01 | 92.06 | 7.64         | 20.45 | 0.64 | 0.41 |
| T2-D45 | 48.98<br>±0.06 | 6.50<br>±0.01 | 27.99<br>±0.28 | 2.63<br>±0.04 | 86.10 | 13.90        | 21.76 | 0.63 | 0.43 |

The method of Fictitious Atomic-Group Separation (FAS) described by Ndira (2006) and Tardy et al. (2000, 2005) was applied to the above results. The ratios between the FAS ( $\text{CH}_2\text{O}/\text{C}_{\text{total}}$ ,  $\text{CH}_2/\text{C}_{\text{total}}$  and  $\text{C}_{\text{dry}}/\text{C}_{\text{total}}$ ) are reported in figure 2.

The addition of lime at the start of treatment 2 acted directly on the initial material: it increased the level of  $\text{CH}_2\text{O}$  and decreased that of  $\text{CH}_2$ . This cannot result from the release of small molecules because the samples were dialysed. It probably results from the opening of peripheral aromatic rings on large molecules through oxidation.

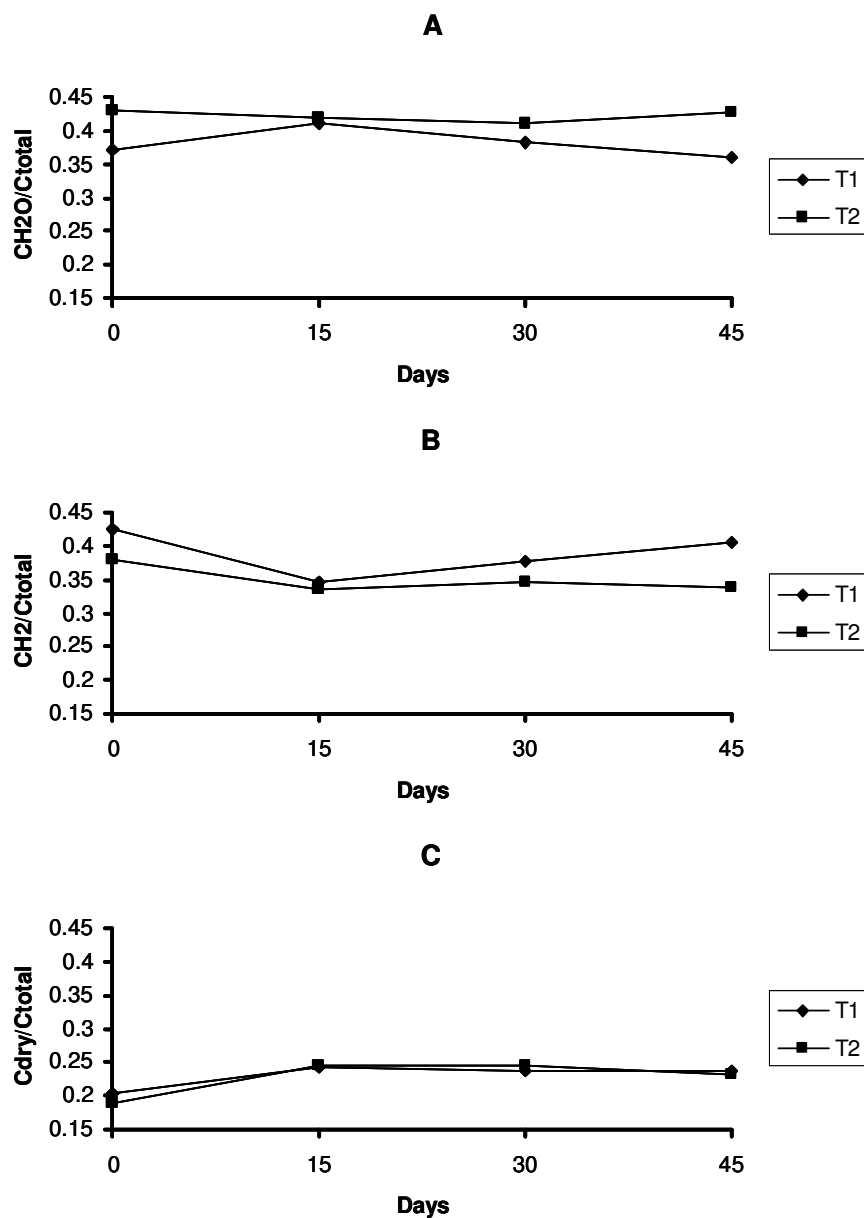
For T1, during the first 15 days, the proportion of  $\text{CH}_2\text{O}$  increased while that of  $\text{CH}_2$  decreased. Microbial attack required about 15 days to reach almost the same result as that obtained by the immediate action of lime. After 15 days, in T1, the proportion of  $\text{CH}_2\text{O}$  decreased while that of  $\text{CH}_2$  rose, indicating the disappearance of oxygen. This can correspond either to the elimination of oxygen groups or more likely to condensation reactions in between oxygen-containing molecules.

For T2, there were fewer relative variations but the proportion of  $\text{CH}_2\text{O}$  rose slightly after the 30<sup>th</sup> day, indicating oxidation of macromolecules during this period.

The ratio  $\text{C}_{\text{dry}}/\text{C}_{\text{total}}$  rose significantly during the first 15 days, which could indicate an increase in the aromatics during this period. After 15 days, the variations were too slight to be significant.

Overall, the addition of lime acted not only on the initial state of the waste water but also on its evolution with time.





**Fig. 2.** Ratios between fictitious chemical groups (FAS) during aerobic treatments  
 A: CH<sub>2</sub>O/C<sub>total</sub> for treatments 1 (T1) and 2 (T2); B: CH<sub>2</sub>/C<sub>total</sub> for treatments 1 (T1) and 2 (T2); C: Cdry/C<sub>total</sub> for treatments 1 (T1) and 2 (T2).

### 3.3. Infrared spectroscopy (FTIR) of the organic matter

Table 3 reports the infrared bands of the treated OMWW, with reference to the works of Ait Baddi et al. (2004), El Hajjouji et al. (2007), Hafidi et al. (2005), Lguirati et al. (2005), Ouatmane (2000) and Smidt and Meissl (2006).

**Table 3.** Absorbance bands from the IR spectra of the treated olive mill waste water

| Wavelength                   | Attribution   |
|------------------------------|---|
| 3400 cm <sup>-1</sup>        | -OH (phenols, alcohols and carboxylic groups).  |
| 2925 cm <sup>-1</sup>        | C-H stretching vibration in aliphatic structures (fatty acids, waxes and various aliphatics).   |
| 2840 cm <sup>-1</sup>        | Symmetrical CH stretching vibrations in -CH <sub>2</sub> (fatty acids and alkanes).   |
| 1716 - 1740 cm <sup>-1</sup> | C=O stretching vibrations in esters, carboxyl COOH and ketone groups.   |
| 1620 - 1660 cm <sup>-1</sup> | C=O stretching vibrations in primary amides<br>C=O stretching vibrations from conjugated ketones, acids and /or quinones<br>Aromatic C=C stretching vibrations. |
| 1550 – 1650 cm <sup>-1</sup> | C=O stretching vibrations in COO <sup>-</sup> (with a weaker bond around 1400 cm <sup>-1</sup> ).   |
| 1540-1570 cm <sup>-1</sup>   | N-H vibrations in secondary amides.   |
| 1525 cm <sup>-1</sup>        | Aromatic C=C stretching vibrations.   |
| 1450 – 1460 cm <sup>-1</sup> | Aliphatic C-H stretching vibrations.  |
| 1384 cm <sup>-1</sup>        | Symmetrical -CH <sub>3</sub> stretching vibrations.   |
| 900 - 1300 cm <sup>-1</sup>  | Vibrations of C-H and deformation of OH functions, carboxyls, C-O of ethers on aromatic rings and N-H of secondary amides.                                      |
| 700 and 900 cm <sup>-1</sup> | Aromatic groups.  |

The spectra for the two treatments were clearly different from the very start. Compared to T1i, the spectra of T2i show, in relative values, a decrease in the -CH groups at around 2925 cm<sup>-1</sup>, another decrease at 1744 cm<sup>-1</sup> and an increase in the peak at 1072 cm<sup>-1</sup>. The addition of lime, raising the pH, obviously modified the habitat for the micro-organisms, but also the ionic environment of the organic matter and thus certain properties of the organic matter, leading to an increase in the signal of the -OH groups (3400 and 1072 cm<sup>-1</sup>).

With increasing duration of the treatment time, the pattern of variation of the -OH /-CH ratio (region 3400/region 2925) during T1 (proportionally fewer -CH groups at the end of treatment) was the opposite of that observed during T2. Moreover, the maximum of the -OH peak (region 3400 cm<sup>-1</sup>) drifted between the initial and the final states: for T1 the drift was too slight to be significant (11 cm<sup>-1</sup>) but for T2 it was sufficient (34 cm<sup>-1</sup>) to be taken into account. At the end of treatment T2 it appears that bound -OH groups make up slightly longer chains which should be carried by larger molecules.

For T2, the  $-CH$  groups (around  $2925\text{ cm}^{-1}$ ) also showed a slight shift ( $22\text{ cm}^{-1}$ ) between the initial (T2i) and final (T2f) states. Here again, it would appear that the lime, by modifying the macromolecular structure, is at the origin of the shift. At the end of the treatment period, as the pH returns to more acid values, this peak in T2f occupies the same position as on T1i and T1f.

During treatment T1, the peak at  $1744\text{ cm}^{-1}$  disappeared. It could correspond to ester carboxyls which can usually be attacked by micro-organisms. There was also an increase in the relative intensity of the peak at  $1638\text{ cm}^{-1}$ . This can be attributed to conjugated ketone  $C=O$  groups,  $C=C$  or conjugated  $C=C$ . This attribution seems to fit best with the phenomena observed, in particular, with the FAS variations between 0 and 45 days.

The action of the lime also brings out the peak at  $1577\text{ cm}^{-1}$ , which then diminished over time. This peak can be attributed to amine and/or carboxylate groups but the absence of specific absorption at around  $3200\text{ cm}^{-1}$  supports  $-COO-$ , especially since there is slight absorbance around  $1400\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.4. $^{13}C$ -NMR Spectroscopy

The  $^{13}C$ -NMR spectra showed the presence of heterogeneous structures. Our interpretation of the spectra was particularly based on the works of Amir et al. (2004), Castaldi et al. (2005), Hafidi et al. (2004), Jouraiphy et al. (2007) and Lguirati et al. (2005).

The signals at 16.7 ppm, 25.4 ppm, 32.5 ppm and 39.5 ppm can be attributed to the carbons of the alkyl chains. The major signal at 32.5 ppm is characteristic of  $(CH_2)_n$  in the fatty acid chains and of ramified aliphatic structures and/or long chains in humic acids (Ouattmane, 2000).

The area from 50 to 105 ppm corresponds to carbons in polysaccharides e.g. oleuropein  $\beta$ D glucopyranose or other glucolipids. The signal around 65.5 ppm mainly arises from the methoxyl groups of aromatic ethers. Amino acids generally give a signal around 61.5 ppm. Carbohydrates appear at 73 ppm, often around 70-90 ppm and at 102 ppm, 106 ppm and 115 ppm which corresponds to anomeric carbons. Unsubstituted aromatic carbons show signals at 118.9 ppm and 128 ppm. Unsaturated carbons ( $C=C$ ) can also be found in this region. Substituted aromatic carbons appear around 134 ppm, 137.5 ppm and 139.7 ppm. The signal at 151.9 ppm is mainly due to phenyl carbons, aromatic ethers and/or N-substituted aromatic carbons. The strong resonances at 173.8 ppm, 177.5 ppm and 184 ppm can come from phenolates or carboxyl and amide moieties.

Comparing the areas under the peaks - aliphatic, aromatic, and carboxylic (table 4) - reveals a high proportion of aliphatic carbons compared to aromatic or carboxylic carbon. For treatment 1, there was an increase, near the end of the treatment, in aliphatic and aromatic carbons. There was also a slight decrease in carboxylic carbon, attributed to the degradation of lipid. In contrast, for treatment 2, the process led to a decrease in aliphatic and carboxylic carbons, and an increase in aromatic carbon.

**Table 4.** Distribution of carbon among various chemical structures in the olive mill waste water as a percentage of the areas under the peaks in the initial (Ti) and final (Tf) stages for treatments 1 and 2

| Stage | C-Aliphatic | C-Aromatic | C-Carboxylic |
|-------|-------------|------------|--------------|
| T1i   | 37.82       | 17.98      | 13.33        |
| T1f   | 47.73       | 18.45      | 12.62        |
| T2i   | 40.53       | 12.30      | 22.54        |
| T2f   | 32.60       | 14.54      | 18.17        |

During the treatments, the microbial population generally used easily degradable aliphatic compounds, lipids and peptides as energy sources. There was also production of volatile fatty acids such as acetic acid, which disappeared during dialysis and which accounted for the drop in pH noted to occur during treatment 2. In parallel, the aromatic structures became substituted with phenol, methoxyl and carboxyl groups, the latter decreasing with time (Amir et al., 2004). The results obtained indicate that the degradable compounds such as the aliphatic chains were modified to generate condensed aromatic structures containing large proportions of hydroxyl, methoxyl, carboxyl and carbonyl groups. These resistant structures are preserved and contribute to the neoformation of humic acids.

#### 4. Conclusion

Aerobic biodegradation of olive mill waste water led to a final product with a pH of 5.4 after treatment 1 and 5.7 after treatment 2 and highly significant decreases in the levels of phenols. The addition of ammonium nitrate favoured the microbial activity, and hence the degradation of the organic matter. Neutralising the pH by the addition of lime (treatment 2) had a positive effect on the degradation of phenols, lowering their levels by about 76%. It also changed the actual structure of the organic matter, as is clearly apparent from the infra-red spectra. Pooling the results of elemental analysis, FTIR, and  $^{13}\text{C}$ -NMR shows that during treatment 2, there was neoformation of humic substances resistant to chemical degradation,

implying polymerisation of the organic matter. The polymerisation leads to the stabilisation of the olive mill waste water, lowering the risks of toxicity upon use as an agricultural amendment.

### **Acknowledgements**

This work was financially supported in part by an Eiffel grant from the French government.

## References

- Adani, F., Genevini, P.L., Gasperi, F., Zorzi, G., 1997. Organic matter evolution index (OMEI) as a measure of composting efficiency. *Compost Sci. Util.* 5, 5-62.
- AFNOR., 1975. Norme T90-1110. Essai des eaux : dosage de l'azote total Kjeldahl.
- Ait Baddi, G., Hafidi, M., Gilard, V., Revel, J.C., 2003. Characterization of humic acids produced during composting of olive mill wastes: elemental and spectroscopic analyses (FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR). *Agronomie.* 23, 661-666.
- Ait Baddi, G., Hafidi, M., Cegarra, J., Alburquerque, J.A., Gonzalvez, J., Gilard, V., Revel, J.C., 2004. Characterization of fulvic acids by elemental and spectroscopic (FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR) analyses during composting of olive mill wastes plus straw. *Bioresour. Technol.* 93, 285-290.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Revel, J.C., 2004. Elemental analysis, FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR of humic acids from sewage sludge composting. *Agronomie.* 24, 13-18.
- Aubert G., 1978. Méthodes d'analyses des sols. Edition C.R.D.P. Marseille.
- Borja, R., Martin, A., Alonso, V., Garcia, I., Banks, C.J., 1994. Influence of different aerobic pre-treatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Res.* 19, 489-495.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Giovannozzi, S., Lo Cascio, B., 2003. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere.* 50, 959-66.
- Castaldi, P., Alberti, G., Merella, R., Melis, P., 2005. Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Manag.* 25, 209-213.
- CAR/PP: Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre., 2000. Plan d'action pour la Méditerranée. Prévention de la pollution dans la production d'huile d'olive.
- Cereti, C.F., Rossini, F., Federici, F., Quarantino, D., Vassilev, N., Fenice, M., 2004. Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertiliser for wheat (*Triticum durum* Desf.). *Bioresour. Technol.* 91, 135-140.
- Chen, L., Magen, H., Riov, H., 1994. Humic substances originating from rapidly decomposing organic matter: properties and effects on plant growth. In: Senesi N., Miano T-M. (Eds.), *Science and Engineering of composting: Design, Environmental, Microbiology and Utilization Aspects*. The Ohio State University, pp. 551-650.

- D'Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F., Petruccioli, M., 2006. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresour. Technol.* 97, 1828-1833.
- Della Greca, M., Previtera, L., Temussi, F., Zarrelli, A., 2004. Low-molecular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochem. Anal.* S15, 184-188.
- Dias, A.A., Bezerra, M., Nazaré, P.A., 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill waste water. *Bioresour. Technol.* 92, 7-13.
- Di Gioia, D., Fava, F., Bertin, L., Marchetti, L., 2001. Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of monocyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 619-626.
- El Hajjouji, H., Fakharedine, N., Ait Baddi, G., Winterton, P., Bailly, J.R., Revel, J.C., Hafidi, M., 2007. Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* 98, 3513-3520.
- Epstein, E., 1997. *The Science of Composting*. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, PE, USA.
- Fakharedine, N., El Hajjouji, H., Ait Baddi, G., Revel, J.C., Hafidi, M., 2006. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during aerobic digestion of olive-mill waste-waters. *Proc. Biochem.* 41, 398-404.
- Gonzalez, M.D., Moreno, E., Quevedo Sarmiento, J., Ramos Cormenzana, A., 1990. Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin): Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere.* 20, 423-432.
- Hafidi, M., Ait Baddi, G., Chetoui, A., 2004. Traitement des effluents liquides d'huileries d'olives par des micro-organismes et suivi du devenir des polyphénols. *Agrochimica.* XLVIII1-2, 1-12.
- Hafidi, M., Amir, S., Revel, J.C., 2005. Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C NMR. *Proc. Biochem.* 40, 2615-2622.
- Hamdi, M., Fiestino, C., Aubart, C., 1992. Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in fixed film treatment. *Bioproc. Engin.* 8, 79-84.
- Hargitai, L., 1994. Biochemical transformation of humic substances during humification related to their environmental functions. *Environ. Int.* 20, 43-48.

- Jouraiphy, A., Amir, S., El Gharous, M., Revel, J.C., Hafidi, M., 2007. Structural study of fulvic acids during the composting of activated sludge - plant matter : Elemental analysis, FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Bioresour. Technol.* (in press).
- Kogel Knabner, I., 2005. Mechanisms and regulation of organic matter stabilisation in soil. *Geoderma*. 128, 1-2.
- Lguirati, A., Ait Baddi, G., El Mousadik, A., Gilard, V., Revel, J.C., Hafidi, M., 2005. Analysis of humic acids from aerated and non aerated urban landfill composts. *Int. Biodeter. Biodegr.* 56, 8-16.
- Macheix, J.J., Fleuriet, X.X., Billot, J.A., 1990. *Fruit phenolics*. CRC Press, Boca Raton Florida.
- Ouabbi, M., 1999. Diagnostic de la consommation d'eau dans une unité de trituration des olives et traitement de ses margines. University report. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Morocco.
- Ouatmane, A., 2000. Etude du compostage de quelques déchets organiques: I- Approche physico-chimique, calorimétriques et spectroscopiques de l'étude de l'état de maturation des composts. II- Analyse qualitative et quantitative de la fraction humique. PhD thesis, University of Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Morocco.
- Ouatmane, A., Dorazio, V., Hafidi, M., Revel, J.C., Senesi, N., 2000. Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography. *Agronomie*. 20, 491-504.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Cegarra, J., Roig, A., 2002. Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresour. Technol.* 85,1-8.
- Piccolo, A., Zaaccheo, P., Genevini, P.G., 1992. Chemical characterization of humic substances extracted from organic waste amended soils. *Bioresour. Technol.* 40, 275-282.
- Procida, G., Ceccon, L., 2006. Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters. *Anal. Chim. Acta*. 561, 103-106.
- Rodier, J., 1971. *L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau*. Ed-DUNOD, Paris.
- Rodier, J., 1984. *L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer*. 7ème édition, Dumond, Paris.



- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazi, S.R., Garcia Romera, I., 2007. Solid-state cultures of *Fusarium oxysporum* transform aromatic components of olive-mill dry residue and reduce its phytotoxicity. *Bioresour. Technol.* 98, 3547-3554.
- Sanchez Monedero, M.A., Cegarra, J., Garcia, D., Roing, A., 2002. Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting. *Biodegradation.* 13, 361-371.
- Scaglia, B., Tambone, F., Genevini, P.L., Adani, F., 2000. Respiration index determination: a dynamic and static approach. *Compost Sci. Util.* 8, 90-98.
- Senesi, N., Miano, T.M., Brunetti, G., 1996. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In: Piccolo A, editor. *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*, pp. 531- 593.
- Smidt, E., 2001. Eignung der FT-IR Spektroskopie zur Charakterisierung der organischen Substanz in Abfällen. PhD thesis, University of Agricultural Sciences, Inst. of Waste Management, Vienna, Austria.
- Smidt, E., Meissl, K., 2006. The applicability of Fourier transforms infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management. *Waste Manag.* 27, 268-276.
- Ndira, V., 2006. Substances humiques du sol et du compost. Analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs : vers une approche thermodynamique. PhD thesis, Institut National Polytechnique, Toulouse, France.
- Tardioli, S., Banne, T.G.E., Santori, F., 1997. Species-specific selection on soil fungal population after olive mill waste water treatment. *Chemosphere.* 34, 2329-2336.
- Tardy, Y., Bailly, J.R., Guiesse, M., Kaemmerer, M., Boutin, M.P., Revel, J.C., 2000. An approach for a thermodynamic treatment of the humic substances in soils and plants nutritional environment. In: *Proceedings of the International Humic Substances Society on Entering the Third Millenium with a common approach to Humic Substances and Organic Matter in Water, soil and Sediment, Proceedings Vol.1.* France: Toulouse, pp. 23-28.
- Tardy, Y., de Toledo, M.C.M., Bailly, J.R., Guiesse, M., Revel, J.C., 2005. Towards the thermodynamic treatment of humic substances in soils. *Revista do Instit. Geológico, São Paulo.* 26(1/2), 45-51.
- Vasquez Roncero, A., Graciani Constante, E., Maestro Duran, R., 1974. Components fenolicos de la aceituna. I- polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites.* 25, 269-279.

- Zenjari, B., Hafidi, M., El Hadrami, I., Bailly, J.R., Nejmeddine, A., 1999. Traitement aérobie des effluents d'huileries par les micro-organismes du sol. *Agrochimica*. 43 vol. XLIII n°5-6, 277-286.
- Zenjari, B., El Hajjouji, H., Ait Baddi, G., Bailly, J.R., Revel, J.C., Nejmeddine, A., Hafidi, M., 2006. Reduction of toxic compounds during the composting of olive mill wastewater-straw mixture. *J. Hazard. Mat.* A138, 433-437.

## Chapitre 3.

### **<sup>13</sup>C-NMR study of the effect of aerobic treatment of olive mill wastewater (OMW) on its lipid-free content**

H. EL HAJJOUJI <sup>a,b</sup>, G. MERLINA <sup>b</sup>, E. PINELLI <sup>b</sup>, P. WINTERTON <sup>c</sup>, J.-C. REVEL <sup>b</sup>, M.  
HAFIDI <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Equipe d'Ecologie Végétale, Sol et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP 2390, Marrakech, Morocco.

<sup>b</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, EcoLab, UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopôle – BP 32607, Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France.

<sup>c</sup> Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne 31062 Toulouse cedex, France.

**\* Corresponding author: hafidi@ucam.ac.ma**

## Présentation

Le suivi des lipides au cours du traitement aérobie des effluents d'huileries d'olive pendant 45 jours montre des variations notables pour les lipides totaux et pour les différentes fractions lipidiques (lipides neutres, monoglycérides et phospholipides) en fonction du traitement choisi (avec ou sans remontée du pH par la chaux). Pour le traitement 1 (sans chaux), une augmentation des lipides est observée tout au long de la période de traitement, celle-ci peut être associée à la phase exponentielle du développement de la communauté microbienne qui s'est mise en place au cours de ce traitement. Par contre, le traitement 2 montre une diminution des lipides, correspondant à une forte diminution des phospholipides traduisant une lyse des micro-organismes initialement présents dans le milieu. A 15 jours, un niveau intermédiaire se rétablit en liaison avec un redémarrage de l'activité microbienne.

La spectroscopie  $^{13}\text{C}$ -RMN effectuée sur les échantillons initiaux et finaux avant et après traitement au solvant (chloroforme/méthanol) montre une différence importante dans le spectre entre l'échantillon initial (1-0d) et son correspondant traité à la chaux (2-0d) correspondant bien à une altération de la partie lipidique (0-50 ppm) due à ce traitement. Elle permet aussi de confirmer les variations observées entre les fractions de lipides obtenues par chromatographie et de montrer la similitude entre le traitement des effluents d'huileries d'olive à la chaux et le traitement au solvant. Les spectres obtenus après le traitement au solvant mettent en évidence deux zones spectrales intéressantes, l'une correspondant aux C O-alkyl (50 -110 ppm) et l'autre concernant les C-carboxylic (160-200 ppm) qui permettent de compléter l'évolution des lipides par des mécanismes mettant en jeu des structures polysaccharidiques.

**Abstract**

Olive mill wastewater was treated by an aerobic bio-process at different values of pH (with or without addition of lime), for 45 days on a laboratory scale, to evaluate the reduction of the organic load. The lipid content showed an appreciable change in relation to the applied treatment both for total lipids and for the different fractions (neutral lipids, monoglycerides and phospholipids).  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy was performed on initial and final samples both raw and after lipid extraction. The main spectral differences were observed in the C-alkyl region (0-50 ppm), in the C O-alkyl/N-alkyl region (50-110 ppm), and in the C-carboxylic (160-200 ppm) region, providing information on the alterations occurring in the different biochemical entities composing this complex biomatrix (e.g. lipids and carbohydrates) according to the treatment.

**Key words:** Olive mill wastewater; Aerobic bio-process; Lime treatment; Lipids;  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy.

## 1. Introduction

Olive mill wastewater (OMW) is the term given to the main liquid by-product generated during the production of virgin olive oils. It is composed partly of the water originally contained in the olives and partly of any other water added during the production process, especially if a three-phase decanter is used [1]. OMW is an acidic matrix (pH 4–5.5) made up of water (83–96%), sugars (1.0–8.0%), nitrogenous substances (0.5–2.4%), organic acids (0.5–1.5%), pectins, mucilage and tannins (1.0–1.5%), lipids (0.02–1.0%) and inorganic substances (0.5–2.0%) [2-4]. OMW shows poor biodegradability, high phytotoxicity due in particular to the presence of phenolic compounds [5-7], free fatty acids (FFA) [1] and inorganic salts (notably potassium) [8-10] and a high microbial load in the form of bacteria, yeasts and fungi [11]. Specifically, the C2–C8 volatile fatty acids (VFA) come from microbial metabolism, whereas the C16–C18 long-chain fatty acids (LCFA) come from the oil originally present in the olives, both showing phytotoxic effects and toxic effects towards microorganisms [1]. For these reasons, OMW have a rather high biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD), which makes their disposal difficult in view of current regulations [12].

Preliminary treatment of OMW is recommended before its agricultural use. A number of ways to process OMW have been employed in recent years, and can be divided into physico-chemical and biological methods. Physico-chemical methods such as decantation, flocculation, ultrafiltration, thermal concentration or incineration can be very expensive and do not solve the problem completely since the sludge resulting from the process must be disposed of too [13]. Biological methods based on composting or anaerobic and aerobic digestion lead to the production of proteins, poly-hydroxy- $\beta$ -butyrates, exopolysaccharides, etc. [14,15]. The latter methods have clear benefits due to the potential utilisation of their bio-products [13].

Since OMW contains variable quantities of residual oil, depending on the extraction process efficiency, and since this effluent is a putative candidate as a potentially suitable liquid growth medium for microorganisms [16], particularly during its storage either in tanks or aerated lagoons [17], it appears useful to see how the lipid content varies over time.

The aim of the present work was to follow the lipid fraction of the treated olive mill wastewater by chromatography and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy, to study the lowering of the potential toxicity of these effluents as reported by D'Annibale et al. [18] during the aerobic treatment.

## 2. Methods

### 2.1 Samples and treatments

Liquid effluent was taken from a modern 3-phase centrifugation olive-oil production unit in the Marrakech area (Morocco). It was submitted to different treatments (T1 and T2) for 45 days with three replicates for each treatment. Treatments were carried out in glass crystallising dishes. The volume of effluent used was 2L/dish.

For T1, ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) was added to bring the C/N ratio to 50.5, the pH was not adjusted (initial value 4.85). Treatment T2 involved bringing the C/N ratio to 48.08 with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and bringing the pH to 6.18 by addition of lime  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . For both treatments, run at ambient temperature ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ), aeration was achieved by bubbling compressed air through the liquids. After homogenisation, samples were taken of the initial effluent at time 0 (after addition of ammonium nitrate for T1 and T2 and lime for T2), then after 15, 30 and finally 45 days. Before studying the organic matter, samples were dialysed (Spectra Por membrane MWCO 1000 Da) to eliminate the excess salts, then freeze dried.

### 2.2 Analysis methods

#### 2.2.1 Standard chemical analyses

All chemical analyses were repeated in triplicate and the values reported here are the means (Table 1).

**Table 1.** Physico-chemical characteristics of the raw OMW

| Parameter                      | Value             |
|--------------------------------|-------------------|
| pH                             | $4.85 \pm 0.01$   |
| Total solids (TS)(g/L)         | $190.45 \pm 1.47$ |
| Total organic carbon (% TS)    | $44.43 \pm 1.99$  |
| Total Kjeldahl nitrogen (% TS) | $0.62 \pm 0.01$   |
| C/N ratio                      | 71.66             |
| Chemical oxygen demand (g/L)   | $234 \pm 4$       |
| Total phenols (g/L)            | $0.79 \pm 0.11$   |
| Total lipids (mg/g TS)         | $50.99 \pm 1.21$  |

The pH was measured at ambient temperature according to the method of Rodier [19]. The total solids content was measured by drying at  $105^\circ\text{C}$  for 24 hours. The total organic carbon (TOC) was determined using Anne's method based on potassium dichromate, as described by Aubert [20]. Total Kjeldahl nitrogen (TKN) was determined using the standard French procedure AFNOR T90-110 [21]. Chemical oxygen demand (COD) was assayed by the method of Rodier [22]. Total phenols were extracted and purified with ethyl acetate, as

reported in Macheix et al. [23] and were assayed according to Folin-Ciocalteu [24]. The total phenol concentration was determined using a standard solution of caffeic acid (20 mg/100ml methanol). The total lipid concentration was determined using the method of Folch et al. [25].

### 2.2.2 Lipid assay

#### Extraction

Lipid was extracted from 5 to 10 g of fresh OMW using the method of Folch et al. [25]. This involved the OMW being macerated with 60 mL of a 2/1 v/v chloroform/methanol mixture for 24 hours at 4°C. The supernatant was then recovered and filtered through a Durieux filter. This was repeated twice more to ensure maximum recovery of the lipid. The pooled supernatants were then shaken with 60 mL of 1% NaCl to separate the methanol from the chloroform phase containing the lipid. The chloroform phase was then dried over anhydrous sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and the total lipid content was determined after evaporation of the chloroform phase at 40°C.

#### Lipid speciation

The separation of neutral lipids (NL), monoglycerides (MN) and phospholipids (PL) was achieved by chromatography on a silica column (Sep-Pak Plus Silica, Waters, Milford, Massachusetts) after elution with 25 mL chloroform, 5mL of a 49/1 chloroform/methanol mixture and 30 mL of pure methanol respectively [26]. The different fractions of lipid obtained were weighed after evaporation to dryness. All solvents used, anhydrous and of analytical quality, were provided by Carlo Erba-S.D.S., F-13124 Peypin.

### 2.2.3 $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance ( $^{13}\text{C}$ -NMR)

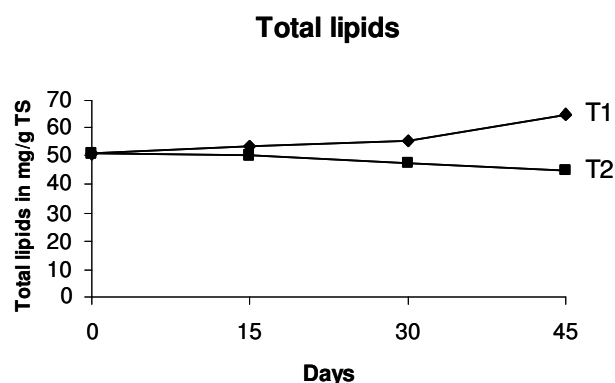
$^{13}\text{C}$ -NMR spectra were obtained on the initial and final OMW and their solvent-treated residues for the two treatments by dissolution of about 150 mg in 3 ml 0.5M NaOD. The spectra were recorded on a Bruker WB-AM 300 spectrometer at 75.4 MHz with a 10 mm probe head. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm, relative to 3-(trimethylsilyl)-propane sulfonic acid sodium salt as external reference. To suppress nuclear Overhauser enhancement, a pulse program with inverse gated proton decoupling was used. Spectra were acquired with a repetition time between impulsions of 2.8s, a sweep width of 16 700 Hz and a pulse width of 5  $\mu\text{s}$  (35°). 50 000-60 000 FID files were accumulated. The FIDs were treated with a 50Hz line-broadening function. Integration of the spectra was performed with Bruker Win NMR software.



### 3. Results and discussion

#### 3.1 Levels of total lipids and of the different lipid fractions

The variation of the levels of total lipids during processes 1 and 2 is presented in figure 1. It can be noted that there is a steady increase in total lipids for process 1: the levels rose from 50.99 to 64.59 mg/g TS after 45 days of treatment. This can be related to the exponential growth phase of the microbial community that occurs during biological treatment [27]. For treatment 2 the level of total lipids decreased, falling from 50.80 mg/g TS at the start of treatment to 45.19 mg/g TS at the end. This decrease is due to the regularly reported decomposition of the lipids of plant and microbial origin [28,29].



**Figure 1.** Concentrations of total lipids at different stages of treatment 1 (T<sub>1</sub>) and treatment 2 (T<sub>2</sub>).

The concentrations of the different lipid fractions (NL, PL and MN) at different stages of treatments 1 and 2 are presented in Table 2. It can be seen that notable differences occur in the initial lipid profile between processes 1 and 2, in particular, strong losses of phospholipid which is more sensitive to lime-induced hydrolysis (1.43 mg/g TS versus 7.37 mg/g TS). The products of this hydrolysis can be partly found in the strong increase of the MN group observed in process 2.

Concerning the evolution of the groups of lipids with time, the variations in the neutral lipids, mainly composed of triglycerides, follows that of total lipid i.e. an increase for treatment 1 and a decrease for treatment 2, in agreement with the microbiological growth observed. For phospholipids, a certain level of stability was noted for treatment 1 while for treatment 2, after having undergone heavy losses (due to lime-induced hydrolysis) the PL increased owing to the growth of a new population of micro-organisms.

**Table 2.** Concentrations of neutral lipids, monoglycerides and phospholipids (mg/g TS) at different stages of the two treatments.

|                          | Treatment 1 |         |         |         | Treatment 2 |         |         |         |
|--------------------------|-------------|---------|---------|---------|-------------|---------|---------|---------|
|                          | 0 days      | 15 days | 30 days | 45 days | 0 days      | 15 days | 30 days | 45 days |
| Neutral lipids (mg/g TS) | 42.38       | 42.30   | 48.73   | 55.14   | 46.47       | 42.50   | 41.77   | 42.45   |
| Monoglycerides (mg/g TS) | 1.23        | 2.64    | 2.15    | 1.58    | 2.86        | 3.51    | 2.83    | 0.69    |
| Phospholipids (mg/g TS)  | 7.37        | 8.81    | 8.30    | 7.88    | 1.43        | 3.94    | 2.83    | 2.05    |

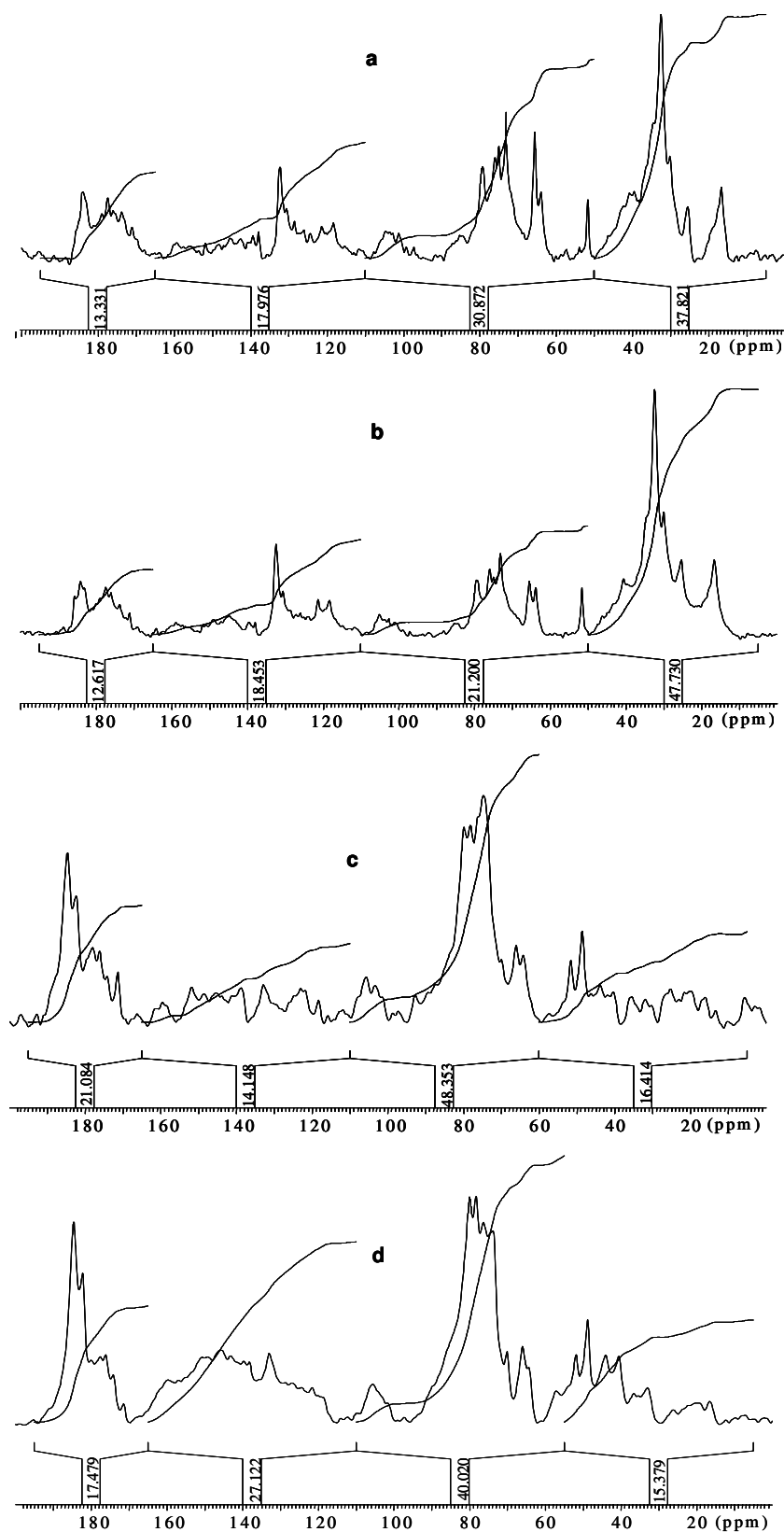
d.w. dry weight

### 3.2 $^{13}\text{C}$ -NMR

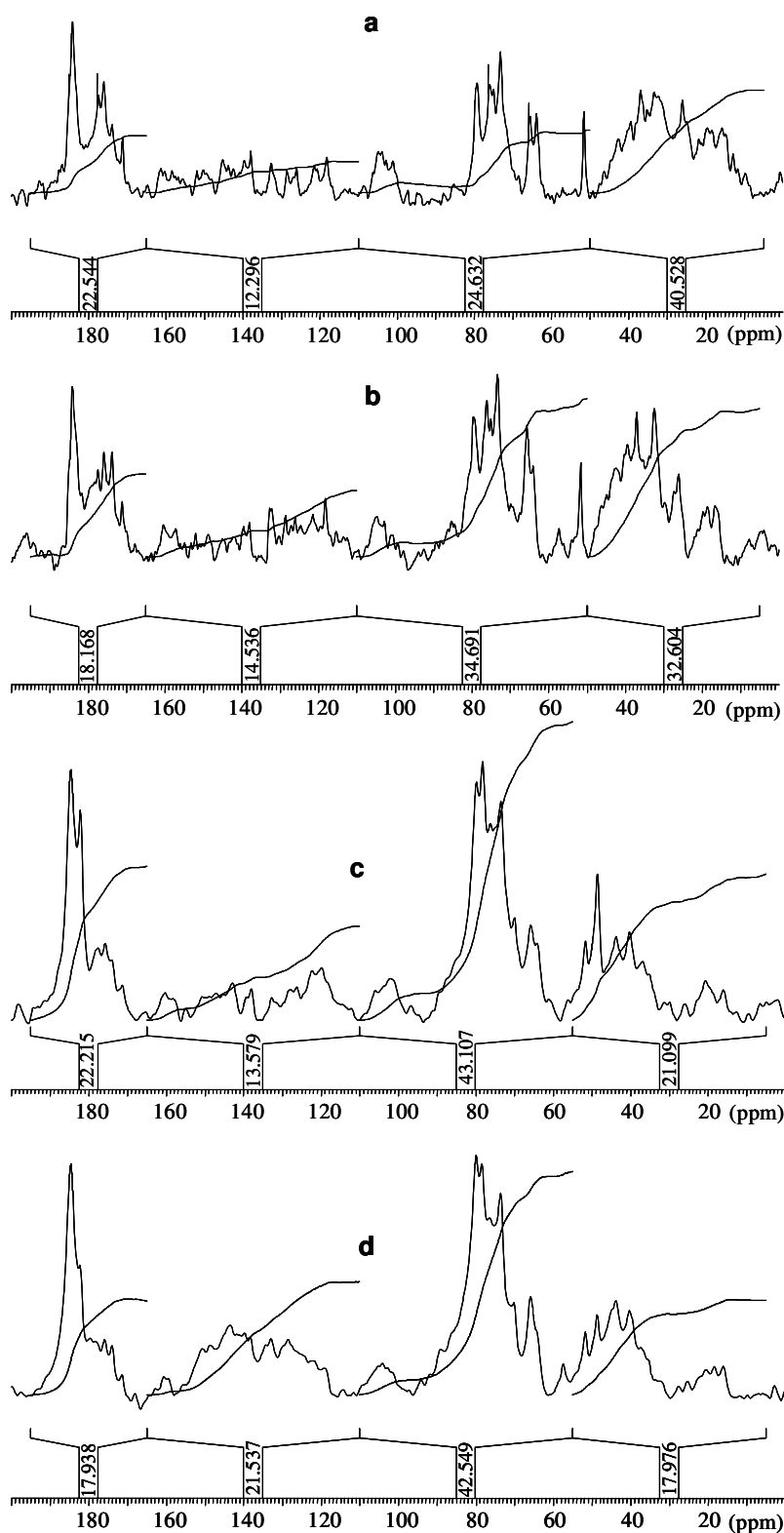
$^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the OMW at the initial and final stages of each process (treatments 1 and 2) before and after lipid extraction are presented in figures 2 and 3. These spectra were interpreted on the basis of the studies of Preston [30]; Barančíková et al. [31], Almendros et al. [32], Kögel-Knaber [33], Ait Baddi et al. [34], Amir et al. [35] and Hafidi et al. [13]. The spectra were characterised by the presence of many signals in the area of paraffinic carbon in alkyl chains (0 and 50 ppm), aliphatic carbon substituted by oxygen and nitrogen and including the methoxyl groups of aromatic ethers (50 and 110 ppm), double bonded or aromatic carbon (110 and 160 ppm) and carboxylic carbon in ester or amide (160 to 200 ppm).

In the area of alkyl carbons, the signal at 16.5 ppm was characteristic of the final methyl group ( $-\text{CH}_3$ ). Signals from 20 to 32 ppm were attributed to  $\text{CH}_2$  groups in the long fatty acid chains by Preston and Schnitzer [36] whereas the signal at 37 ppm was characterized as  $(\text{CH}_2)_n$  in the long chains of other alkyls [37]. However, Ouattmane [38] attributed the presence of the latter peak to ramified aliphatic structures and/or long chains in humic acids.

The resonances observed between 40 and 105 ppm were generated by carbons bound directly to an oxygen heteroatom as in alcohols and carbohydrates or nitrogen as in amines and amino acids. These resonances could also be attributed to carbons bound to groups such as aldehydes and ketones [39]. The signals at 66; 70 to 80 and 105 ppm were found to correspond to the  $\beta$ -D glucopyranose units present in cellulose [39] and in oleuropeine, a compound of interest in OMW.



**Figure 2.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of OMW before and after solvent lipid extraction at initial and final stages of treatment 1  
 a: 0 days before solvent lipid extraction; b: 45 days before solvent lipid extraction; c: 0 days after solvent lipid extraction; d: 45 days after solvent lipid extraction.



**Figure 3.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of OMW before and after solvent lipid extraction at initial and final stages of treatment 2

a: 0 days before solvent lipid extraction; b: 45 days before solvent lipid extraction; c: 0 days after solvent lipid extraction; d: 45 days after solvent lipid extraction.

The aromatic region (110-160 ppm) can be divided into three parts, one between 110 and 130 ppm for unsubstituted aromatic carbons, another between 130 and 145 ppm for C-substituted aromatic carbons and the last between 145 and 160 ppm for O or N substituted aromatic carbons [35]. The signal in the 141-159 ppm range is assigned to phenolic carbons in lignin units [40]. This region can also be attributed to the resonance of carbons in steroids such as cholesterol (121.3; 141.2 and 160.5 ppm) and ergosterol (119.4; 136.0 and 140.7 ppm) [41].

The carboxylic region (160-200 ppm) can be divided into two parts, one between 160 and 184 ppm for carboxylic acids ( $-\text{COOH}$ ) mainly organic acid that are free or involved in esters or amides, and the second between 184 and 200 ppm for the carbonyl group ( $-\text{C}=\text{O}$ ) present in aldehydes, ketones and organic acids [42]. In the present case, this region is of interest for the different fatty acids and particularly for the phospholipids characterized by a carbonyl band between 173.0 and 173.4 ppm [43]. Other compounds such as pectin polysaccharides mainly present in the cell wall pulp (hexuronic acids) [44], which also present a carbonyl group, could resonate at 176.8 and 177.4 ppm [45].

The NMR spectra in samples 1 and 2 (spectra 2-a and 2-b; spectra 3-a and 3-b) presented the same general pattern at the start and at the end of the treatments suggesting that neither treatment greatly modified the biochemical entities initially present in the samples. With respect to spectrum 2a, which can be considered as a reference for the study, large variations can be seen for the peaks at 16.7 and 32.5 ppm as well as for the peak at 184.2 ppm in spectrum 3-a, which follows initial treatment with lime. This results from the hydrolysis of esters, especially of fatty acid esters, to give carboxylic acids. The same changes (spectra 2-c and 3-c) were observed after solvent treatment, confirming that the lipid part of the samples was easily accessible to external actions (chemical removal or solvent extraction). For all samples treated with solvent (spectra 2-c and 2-d ; spectra 3-c and 3-d), amplification is seen to occur in the continuum between 73 and 79 ppm which corresponds to the simultaneous resonance of C-2, C-3 and C-5 of polysaccharides such as the resonance of pyranosides in cellulose and hemicellulose [46]. This part of the spectrum is in agreement with the fact that OMW could represent a source of simple and complex sugars, which might be a basis for fermentation processes [47].

Integration of the C-alkyl region of the initial and final samples proved to give identical values for the two treatments (tables 3-a and 3-b), indicating that for the first treatment, there was an increase in the percentage of C-alkyl derivatives attributed to the C-

aliphatic of the fatty acids, while in treatment 2, there was a decrease. In the C-carboxylic region, while the decreases observed for the untreated samples were rather low, solvent treatment showed a notable decrease (4%) in C-carboxylic, which could indicate the occurrence of a certain level of mineralisation of the organic matter, particularly from the lipid part in treatment 2. In contrast, for C-aromatic, there was a sharp increase in the signal, confirming the increase in aromaticity of the final products, as previously reported concerning the transformation of polyphenols into polymerised aromatic compounds [7].

Based on the NMR determination of the carbon functions, the different biochemical entities present in the organic matter were evaluated as follows (tables 4-a and 4-b):

C-alkyl x 14/12; O-alkyl/N-alkyl x 30/12; C-aromatic x 13/12 and C-aliphatic x 44/12.

This enables an estimation to be made of their weight contribution to the biomatrix. The resulting glycosidic carbon contribution in this study (30 - 52%) was of the same order as that reported elsewhere [47].

This approach enables us to confirm the results of the method based on the integration areas, i.e. the differentiation between the two treatments for the C-alkyl and the increase in the degree of aromaticity. The variations in the O-alkyl/N-alkyl region (50–110 ppm) indicate that the lime treatment caused a fall in the initial levels of O-alkyl/N-alkyl derivatives (drop from 40.7 to 30.1%) to the advantage of C-carboxylic derivatives (rise from 25.8 to 40.4%), also affecting the C O-alkyl/C-carboxyl ratio for samples 1-0d/2-0d which fell from 1.6 to 0.7%. This suggests the degradation of certain carbohydrate derivatives such as pectins to give uronic acids [44]. For treatment 1, comparison of the initial, final and treated spectra showed a decrease in the polysaccharides of about 5 to 10%, this source of carbon being available for the synthesis of lipid. The difference between the two treatments for the production of lipid is therefore confirmed. Thus, for treatment 1, the increase in the C-alkyl and the constant C-carboxylic levels, giving rise to an increase in the C-alkyl/C-carboxylic ratio between the initial and the final states, clearly confirms the conservation of the ester bonds of the fatty acids. For treatment 2, the decrease in the C-alkyl derivatives is paralleled by a similar decrease in C-carboxylic, leading to a stable ratio of 0.6, confirming that the lime treatment also altered the lipid entities.

**Table 3-a.** Carbon distribution at the initial and final stages for treatment 1 before and after solvent lipid extraction.

| Stage    | C-alkyl <sup>a</sup> | O-alkyl/N-alkyl <sup>a</sup> | Aromatic <sup>a</sup> | Carboxylic <sup>a</sup> |
|----------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1- 0d    | 37.82                | 30.87                        | 17.98                 | 13.33                   |
| 1- 45d   | 47.73                | 21.20                        | 18.45                 | 12.62                   |
| 1- 0d s  | 16.41                | 48.35                        | 14.15                 | 21.08                   |
| 1- 45d s | 15.38                | 40.02                        | 27.12                 | 17.48                   |

<sup>a</sup>Values are expressed as percentages of the whole spectral area.

d: days; s: solvent lipid extraction

**Table 3-b.** Carbon distribution at the initial and final stages for treatment 2 before and after solvent lipid extraction.

| Stage    | C-alkyl <sup>a</sup> | O-alkyl/N-alkyl <sup>a</sup> | Aromatic <sup>a</sup> | Carboxylic <sup>a</sup> |
|----------|----------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 2- 0d    | 40.53                | 24.63                        | 12.30                 | 22.54                   |
| 2- 45d   | 32.60                | 34.69                        | 14.54                 | 18.17                   |
| 2- 0d s  | 21.10                | 43.11                        | 13.58                 | 22.21                   |
| 2- 45d s | 17.98                | 42.55                        | 21.54                 | 17.94                   |

<sup>a</sup>Values are expressed as percentages of the whole spectral area.

d: days; s: solvent lipid extraction

**Table 4-a.** Carbon contribution to the bio-matrix at the initial and final stages for treatment 1 before and after solvent lipid extraction.

| Stage    | C-alkyl | O-alkyl/N-alkyl | Aromatic | Carboxylic |
|----------|---------|-----------------|----------|------------|
| 1- 0d    | 23.27   | 40.69           | 10.27    | 25.77      |
| 1- 45d   | 31.83   | 30.30           | 11.42    | 26.45      |
| 1- 0d s  | 8.23    | 51.96           | 6.59     | 33.22      |
| 1- 45d s | 8.49    | 47.31           | 13.89    | 30.31      |

d: days; s: solvent lipid extraction

**Table 4-b.** Carbon contribution to the bio-matrix at the initial and final stages for treatment 2 before and after solvent lipid extraction.

| Stage    | C-alkyl | O-alkyl/N-alkyl | Aromatic | Carboxylic |
|----------|---------|-----------------|----------|------------|
| 2- 0d    | 23.08   | 30.06           | 6.51     | 40.35      |
| 2- 45d   | 18.36   | 41.87           | 7.60     | 32.16      |
| 2- 0d s  | 10.77   | 47.16           | 6.44     | 35.63      |
| 2- 45d s | 9.69    | 49.14           | 10.78    | 30.39      |

d: days; s: solvent lipid extraction

#### **4. Conclusion**

Monitoring the behaviour of lipids during the aerobic treatment of olive mill wastewater for 45 days shows notable variations for total lipid and its component fractions (neutral lipids, monoglycerides and phospholipids) depending on whether lime was added before microbial degradation or not.

$^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy carried out on the initial and final samples before and after solvent extraction revealed large differences in the spectrum between the initial sample (1-0d) and its lime-treated counterpart (2-0d). The main spectral differences were observed in the C-alkyl region (0-50 ppm), in the C O-alkyl/N-alkyl region (50-110 ppm), and in the C-carboxylic (160-200 ppm) region, providing information on the alterations occurring in the different biochemical entities composing this complex biomatrix (e.g. lipids and carbohydrates) according to the treatment.

#### **Acknowledgement**

This work was financially supported in part by an Eiffel grant from the French government.



## References

- [1] G. Procida, L. Ceccon, Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters, *Anal. Chim. Acta.* 561 (2006) 103-106.
- [2] F. Camurati, A. Lanzani, A. Arpino, C. Ruffo, E. Fedeli, Le acque di vegetazione della lavorazione delle olive: tecnologie ed economie di recupero di sottoprodotti, *Riv. Ital. Sost. Gras.* 61 (1984) 283-292.
- [3] I. Wlassics, F. Burzio, W. Visentin, Peroxidase + hydrogen peroxide: an effective and ecological method for the treatment of waste waters of the olive processing, *Sost. Gras.* 69 (1992) 141-145.
- [4] J.A. Fiestas Ros de Ursinos, R. Borja Padilla, Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain, *Grasas Aceit.* 43 (1992) 101-106.
- [5] S. Sayadi, N. Allouche, M. Jaoua, F. Aloui, Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment, *Process Biochem.* 35 (2000) 725-735.
- [6] B. Zenjari, H. El Hajjouji, G. Ait Baddi, J.R. Bailly, J.C. Revel, A. Nejmeddine, M. Hafidi, Reduction of toxic compounds during the composting of olive mill wastewater-straw mixture, *J. Hazard. Mater.* A138 (2006) 433-437.
- [7] H. El Hajjouji, N. Fakharedine, G. Ait Baddi, P. Winterton, J.R. Bailly, J.C. Revel, M. Hafidi, Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy, *Biores. Technol.* 98 (2007) 3513-3520.
- [8] M. Hamdi, C. Festino, C. Aubart, Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in fully mixed reactors and in fixed film reactors, *Process Biochem.* 27 (1992) 37-42.
- [9] A. Ramos-Cormenzana, M. Monteoliva-Sanchez, M.J. Lopez, Bioremediation of alpechin, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 35 (1995) 249-268.
- [10] I. Garcia Garcia, P.R. Jimenez Pena, J.L. Bonilla Venceslada, A. Martin Martin, M.A. Martin Santos, E. Ramos Gomez, Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, *Process Biochem.* 35 (2000) 751-758.
- [11] M. Mouncif, S. Tamoh, M. Faid, A. Achkari-Begdouri, A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco, *Grasas Aceit.* 44 (1993) 335-338.

- [12] M. Chakchouk, M. Hamdi, J.N. Foussard, H. Debellefontaine, Complete treatment of olive mill wastewaters by a wet air oxidation process coupled with a biological step, Environ. Technol. 15 (1994) 323-332.
- [13] M. Hafidi, S. Amir, J.C. Revel, Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C NMR, Process Biochem. 40 (2005) 2615-2622.
- [14] C. Paredes, M.P. Bernal, J. Cegarra, A. Roig, Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes, Biores. Technol. 85 (2002) 1–8.
- [15] M. Hamdi, R. Ellouz, Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process, Environ. Technol. 19 (1993) 183–8.
- [16] C. Scioli, L. Vollaro, The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. Water Res. 31 (1997) 2520–2524.
- [17] B. Millan, R. Lucas, A. Robles, T. Garcia, G.A. de Cienfuegos, A. Galvez, A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoons with emphasis on Wlamentous fungi and biodegradative potential, Microbiol. Res. 155 (2000) 143–147.
- [18] A. D’Annibale, G.G. Sermanni, F. Federici, M. Petruccioli, Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production, Biores. Technol. 97 (2006) 1828-1833.
- [19] J. Rodier, L’analyse chimique et physico-chimique de l’eau, Ed-DUNOD., Paris, 1971.
- [20] G. Aubert, Méthodes d’analyses des sols, Edition C.R.D.P., Marseille, 1978.
- [21] AFNOR, Norme T90-1110. Essai des eaux : dosage de l’azote total Kjeldahl, 1975.
- [22] J. Rodier, L’analyse de l’eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 7ème édition., Dumond, Paris, 1984.
- [23] J.J. Macheix, X.X. Fleuriet, J.A. Billot, Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990.
- [24] A. Vasquez Roncero, E. Graciani Constante, R. Maestro Duran, Componentes fenolicos de la aceituna. I- polifenoles de la pulpa, Grasas y Aceites. 25 (1974) 269-279.
- [25] J. Folch, M. Lees, S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J. Biol. Chem. 226 (1957) 497-509.
- [26] P. Juaneda, G. Rocquelin, Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges, Lipids. 20 (1985) 40-41.
- [27] C.O. Gill, M.J. Hall, C. Ratledge, Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 33 (1977) 231-239.

- [28] J.R. Vestal, V.L. McKinley, Microbial activity in composting municipal sewage sludge, Research and Development. USEPA, Cincinnati OH, 1986.
- [29] K. Nakasaki, Degradation of fats during thermophilic composting of organic waste, Waste Manage. Res. 22 (2004) 276-282.
- [30] C. Preston, Application of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects, Soil Sci. 161 (1996) 144-166.
- [31] G. Barančíková, N. Senesi, G. Brunetti, Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types, Geoderma. 78 (1997) 251-266.
- [32] G. Almendros, J. Dorado, F.J. González-Vila, M.J. Blanco, U. Lances,  $^{13}\text{C}$  NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass, Soil Biol. Biochem. 32 (2000) 793-804.
- [33] I. Kögel-Knaber, Analytical approaches for characterizing soil organic matter, Org. Geochem. 3 (2000) 609-625.
- [34] G. Ait Baddi, M. Hafidi, V. Gilard, J.C. Revel, Characterization of humic acids produced during composting of olive mill wastes: elemental and spectroscopic analyses (FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR, Agronomie. 23 (2003) 661-666.
- [35] S. Amir, M. Hafidi, G. Merlina, J.C. Revel, Structural changes in lipid-free humic acids during composting of sewage sludge, Int. Biodeterior. Biodegrad. 55 (2005) 239-246.
- [36] C.M. Preston, M. Schnitzer, Effects of chemical modifications and extractants on the Carbon- $^{13}$  NMR spectra of humic materials, Soil Sci. Soc. Am. J. 48 (1984) 305-311.
- [37] L.P. Lindeman, J.Q. Adams, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy: chemical shifts for the paraffins through  $\text{C}_9$ , Anal. Chem. 43 (1971) 1245-1251.
- [38] A. Ouattmane, Etude du compostage de quelques déchets organiques: I-Approche physico-chimique, calorimétrique et spectroscopique de l'étude de l'état de maturation des composts. II- Analyse qualitative et quantitative de la fraction humique, Morocco: Semlalia Faculty of Sciences Marrakech, Cadi Ayyad University; Ph.D. Thesis; 2000.
- [39] J.F. Haw, G.E. Marciel, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopic study of wood pulping with cross polarization and magic-angle spinning, Anal. Chem. 56 (1984) 1323-1329.
- [40] L.E. de Montigny, C.M. Preston, P.G. Hatcher, I. Kögel-Knaber, Comparison of humus horizons from two ecosystem phases on northern Vancouver Island using  $^{13}\text{C}$  CPMS NMR spectroscopy and CuO oxidation, Can. J. Soil Sci. 73 (1993) 9-25.

- [41] E. Breitmaier, W. Voelter, Carbon-<sup>13</sup> NMR spectroscopy. High-resolution methods and application in organic chemistry and biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1987.
- [42] M.L. Malcolm, The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments, Anal. Chim. Acta. 232 (1990) 19-30.
- [43] F.C. Nichols, B. Riep, J. Mun, M.D. Morton, T. Kawai, F.E. Dewhirst, M.B. Smith, Structures of biological activities of novel phosphatidylethanolamine lipids of *Porphyromonas gingivalis*, J. Lipid Res. 47 (2006) 844-853.
- [44] I. Mafra, A.S. Barros, C. Nunes, R. Vitorino, J. Saraiva, A.C. Smith, K.W. Waldron, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, Ripening-related changes in the cell walls of olive (*Olea europaea* L.) pulp of two consecutive harvests, J. Sci. Food Agri. 86 (2006) 988-998.
- [45] T.N. Huckerby, R.M. Lauder, G.M. Brown, I.A. Nieduszynski, K. Anderson, J. Boocock, P.L. Sandall, S.D. Weeks, Characterization of oligosaccharides from the chondroitin sulfates <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR studies of reduced disaccharides and tertrasaccharides, Eur. J. Biochem. 268 (2001) 1181-1189.
- [46] W. Kolodziejska, J.S. Frye, G.E. Marciel, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry with cross polarization and magic-angle spinning for analysis of lodgepole pine wood, Anal. Chem. 54 (1982) 1419-1424.
- [47] S. Crognale, F. Federici, M. Petruccioli,  $\beta$ -glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters, Biotechnol. Lett. 25 (2003) 2013–2015.

## **II. Caractérisation des effluents d'huileries d'olive au cours du traitement chimique. Approches physico-chimiques et spectroscopiques.**

Cette partie se compose d'un chapitre :

### **Chapitre 1: Publication 4**

**EL HAJJOUJI H**, BARJE F, PINELLI E, BAILLY J.-R, RICHARD C, WINTERTON P, REVEL J.-C, HAFIDI M. Photochemical UV/TiO<sub>2</sub> treatment of olive mill wastewater (OMW). **Bioresources Technology** (in press).

## Chapitre 1.

# Photochemical UV/TiO<sub>2</sub> treatment of olive mill wastewater (OMW)

H. EL HAJJOUJI <sup>a,b</sup>, F. BARJE <sup>a</sup>, E. PINELLI <sup>b</sup>, J.-R. BAILLY <sup>b</sup>, C. RICHARD <sup>c</sup>,  
P. WINTERTON <sup>d</sup>, J.-C. REVEL <sup>b</sup>, M. HAFIDI <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Equipe Ecologie Végétale, Sol et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP 2390, Marrakech, Morocco.

<sup>b</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, EcoLab, UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopole – BP 32607, Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France.

<sup>c</sup> Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, UMR 6505-Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France.

<sup>d</sup> Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

**Corresponding author: hafidi@ucam.ac.ma**

## Présentation

Le traitement des effluents d'huileries d'olive par photocatalyse utilisant  $\text{TiO}_2$  sous UV a été effectué à l'échelle du laboratoire pendant 24 heures. La demande chimique en oxygène (DCO) diminue de 22.22%, la coloration (UV à 330 nm) de 57% et les phénols de 94.34%. La disparition des phénols est presque totale. L'écart entre les 3 abattements indique la persistance d'intermédiaires de dégradation non colorés et non phénoliques qui seront détruits ultérieurement. Le processus d'oxydation attaque fortement les structures azotées en début de traitement et fait augmenter la teneur en oxygène des molécules non encore dégradées.

L'application de la méthode des Fictitious Atomic-Group Separation (FAS) confirme l'augmentation du niveau d'oxydation du carbone et indique que l'attaque porte d'abord et plus fortement sur les structures aromatiques auxquelles correspond globalement le groupement fictif  $\text{CH}_2$ .

La spectroscopie UV-visible montre une diminution de l'absorption dans toute la gamme de longueur d'onde, de 700 à 300 nm, ce qui correspond à la dégradation des molécules colorées. L'augmentation lente du rapport  $E_4/E_6$  correspondrait à une diminution progressive de la condensation aromatique, c'est-à-dire à une attaque de ces structures. La spectroscopie IRTF confirme les résultats obtenus ci-dessus et montre qu'il y a évidemment une attaque prioritaire des parties aromatiques des macromolécules non dialysantes, accompagnée d'une attaque nettement moindre des parties hydroxylées et peut-être par des réactions intermédiaires d'hydroxylation. Aussi, elle fait apparaître dans le processus de dégradation l'existence de 3 phases successives qui peuvent correspondre à 3 types différents de molécules dans les effluents d'huileries d'olive.

**Abstract**

Olive mill wastewater (OMW) was treated by photocatalysis using  $\text{TiO}_2$  under UV irradiation on the laboratory scale. The chemical oxygen demand, the coloration at 330 nm, and the level of phenols all showed decreases which, after a 24-hour treatment, reached 22%, 57% and 94%, respectively. The differences between these three values indicate the persistence of colourless, non-phenolic compounds. Application of the novel Fictitious Atomic-Group Separation method showed an increase in carbon oxidation state and confirmed that the attack primarily concerns, aromatic moieties. A fine spectroscopic study revealed the occurrence of three successive phases during the degradation process, thought to correspond to three different categories of molecules in the OMW and the presence of pectin compounds.

**Keywords:** Olive mill wastewater, UV/ $\text{TiO}_2$ , Elemental Analysis, Fictitious Atomic-Group Separation, UV-visible Spectroscopy, IRTF Spectroscopy.



## 1. Introduction

The production of olive oil in the Mediterranean countries accounts for approximately 95% of the world production. It generates around 30 million m<sup>3</sup> of wastewater a year (Chamkha et al., 2001; Tabet et al., 2006). According to some reports, the chemical oxygen demand and biological oxygen demand (COD and BOD) values of these wastewaters are 200 - 400 times higher than those of typical municipal sewage. The very high levels of organic matter are mainly due to phenols, polyphenols, pectins, colloids, lipids and simple aromatic compounds resulting from olive cell wall degradation during oil extraction (Al Mallah et al., 2000; Centi et al., 2000; Chamkha et al., 2001).

To overcome these environmental problems, several biochemical techniques (ultrafiltration, coagulation, evaporation, etc.) have been tried (Fountoulakis et al., 2002) but owing to their high cost, few have ever been applied on an industrial scale. Other propositions involve the use microorganisms for anaerobic (Ramos Cormenzana et al., 1995) or aerobic digestion (Dias Albino et al., 2004). Composting seems to be one of the most advantageous processes because it eliminates potentially dangerous residues and the final product can be used to improve soil quality.

Photocatalytic processes (Ollis and Al Ekabi, 1993) may be an alternative method. Heterogeneous photocatalysis, involving photoinduced redox reactions at the surface of semiconductor minerals, is a promising technique for the treatment of water contaminated by organic molecules (Hoffmann et al., 1995; Selli et al., 1999). Among the semiconductors available, titanium dioxide, or titania, is the most widely used in due to its outstanding stability (Frank and Bard, 1977).

The mechanism of photocatalysis by UV/TiO<sub>2</sub> has been described by several authors: Selli et al. (1999); Tanaka et al. (1999); Lanzalunga and Bietti (2000); Machado et al. (2000) and Chang et al. (2004), who have studied the degradation of various wastes, in particular lignin.

This paper reports the photocatalytic (UV/TiO<sub>2</sub>) degradation of olive mill wastewater (OMW) as studied by elemental analysis, specially using the novel method of Fictions Atomic-Group Separation (Tardy et al., 2005) and UV-visible and Fourier transform IR spectroscopy.

## 2. Methods

### 2.1. Origin and physical-chemical characteristics of OMW

The wastewater was taken from a modern three-phase centrifugation olive mill in Marrakech, Morocco. The main characteristics of the raw effluent were: electrical conductivity (EC) ( $44.3 \pm 0.2$  mS/cm) and pH ( $4.80 \pm 0.01$ ), which were measured at ambient temperature following the recommendations of Rodier (1971). The dry matter content ( $168.9 \pm 7.4$  g/L) was measured by drying at  $105^\circ\text{C}$  for 24 hours. Ashes ( $39.0$  g/L) were determined by weighing after ignition at  $550^\circ\text{C}$  for 24 hours. The organic matter ( $129.9 \pm 6.7$  g/L) was obtained by difference. Total phenols ( $970 \pm 9$  mg/L) were extracted using ethyl acetate in the presence of phosphoric acid and ammonium sulphate (Macheix et al., 1990), and were assayed using Folin-Ciocalteu reagent. The chemical oxygen demand (COD) ( $135 \pm 4$  g/L) was determined using potassium dichromate, as described by Rodier (1987).

### 2.2. $\text{TiO}_2$ /UV treatment

OMW was diluted to 1/100 and filtered through a  $0.45\ \mu\text{m}$  glass fibre filter. The photocatalyst was  $\text{TiO}_2$  Degussa P25. It was added at a level of 1g/L. The reactor had a working volume of  $100\ \text{cm}^3$ . The reactor was composed of a water-cooled double-walled Pyrex glass tube. The reaction mixture was continuously homogenised by magnetic stirring. It was illuminated by a vertical UV tube TLAD Philips 415W/05 (300-450 nm with an emission maximum at 365 nm). During the reaction, the suspension was maintained under constant oxygen bubbling. The medium was mixed in the dark during half an hour prior to irradiation to allow adsorption of the OMW organic matter onto  $\text{TiO}_2$  particles. Samples were collected at -0.5h and 0h before irradiation and at 4h, 8h, 16h and 24h during irradiation. They were filtered using  $0.45\ \mu\text{m}$  Millipore filters to eliminate excess  $\text{TiO}_2$  prior to analysis.

### 2.3. Elemental analysis (CHON)

The instruments used for C, H and N were a Fison Carlo Erba EA 1110, and a Carlo Erba 1106 for O. About 1 mg ( $0.8 - 1.2$  mg) of the sample in a capsule made of tin (assay of C, H and N) or of silver (for assaying oxygen) was burned at  $920-1000^\circ\text{C}$ . The quantity of each element is expressed in percent mass. Each determination was performed in duplicate. The raw results of the elemental analysis are expressed in weight % of C, H, O and N in the test aliquot. The sum of the four percentages gives the overall percentage of organic components. The difference from 100 gives the mineral fraction (ash).

In order to examine just the organic fraction and allow comparisons of the quality to be made, the total level of organic matter was expressed as 100% and the percentages of the four elements C, H, O and N were recalculated. Then, the molar formula was calculated by dividing the percentages by the atomic weight of the corresponding element. The rough overall formula,  $C_xH_yO_zN_w$ , was then obtained, and firstly gives the ratios between the different atoms. Then the Fictitious Atomic-Group Separation (FAS) method described by Tardy et al. (2000, 2005) and Ndira (2006) can be applied. As this technique is relatively recent, some instruction could prove useful.

1. Multiply the overall rough formula with a factor determined in such a manner that the value of N in the formula equals 1.
2. As N is essentially present in the form of peptide linkages ( $-\overset{|}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\overset{|}{\text{CH}}-$ ), remove an -NH group. The overall formula can then be written  $C_mH_nO_p$ , in which  $C_m$  represents “C total”.
3. Calculate the maximum possible number of  $\text{CH}_2\text{O}$  groups (fictitious, of course), which give “C hydrated”. What remains is available C and, according to the sample studied, H or O, one excluding the other.
4. Determine the number of  $\text{CH}_2$  groups (again fictitious) which correspond to “C reduced” or CO groups which correspond to “C oxidised”.
5. Generally there is some remaining C, which can be referred to as “C dry” or “C free”.
6. Now establish the ratios of the fictitious functional groups between each other and with “C total”.
7. Finally calculate the oxidation state of the carbon  $C^x$  by using either of the formulae:

$$C^x = 2 \text{ CO} / C_{\text{total}} \quad \text{or} \quad C^x = 2 \text{ CH}_2 / C_{\text{total}}$$

in which CO is + and  $\text{CH}_2$  is -.

$\text{CH}_2\text{O} / C_{\text{total}}$  is the C hydration index while  $C_{\text{free}} / C_{\text{total}}$  and  $C_{\text{free}} / \text{CH}_2\text{O}$  are the indexes of C dehydration and polymerisation, and  $C^x$  is an index of C oxidation or reduction of (Tardy et al., 2000; 2005).

#### 2.4. Ultraviolet-visible spectroscopy

The UV-visible spectra of treated OMW were recorded on an Ultraviolet SP 1800 spectrophotometer between 300 and 700 nm. The  $E_4/E_6$  ratio (absorbance at 465 / absorbance at 665 nm) was determined for each sample (Chen et al., 1977).

### 2.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Potassium bromide pellets of each sample were prepared by pressing, under vacuum, a mixture of 250 mg of dried KBr and 1 mg of dialyzed and lyophilized sample. The spectra were obtained using a FTIR Perkin Elmer 1600 spectrophotometer over a range of 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$ , at a rate of 16 nm/s. They were recorded in absorbance to allow a valid comparison of the ratios of the absorbance peaks.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Variation of the physical-chemical characteristics of OMW (Table 1)

The pH rose slightly after the addition of  $\text{TiO}_2$  into the OMW solution, following adsorption of the organic matter onto titania particles. A small pH decrease was observed between 8 and 24 hours of irradiation (about 0.5 pH unit). It can be explained by formation of acidic functions through oxidation. The electrical conductivity decreased during the 0.5-hour dark step due to the adsorption of ions onto  $\text{TiO}_2$  (causing the rise in pH), then it slightly increased after 8h of irradiation, which could indicate progressive mineralisation and release of mineral ions, which formed salts. COD and total phenols decreased during the 0.5h stirring step in the dark by 11 % and 33 %, respectively. It can be explained by adsorption of the organic matter onto  $\text{TiO}_2$ . During the illuminated phase, COD fell from 1.3 g/L to 1.05 g/L showing that mineralisation occurred. After 24h of irradiation, mineralisation reached 22%. The drop in total phenols was much greater reaching about 96 % after 24 hours. The value 10.40 mg/L at 4h of UV/ $\text{TiO}_2$  is probably due to the formation of intermediates during the oxidation of polyaromatic compounds.

**Table 1.** Physical-chemical characteristics of OMW during the treatment

|                                | Dark step |       | Irradiation step |       |        |        |
|--------------------------------|-----------|-------|------------------|-------|--------|--------|
|                                | -0.5h     | 0h    | 4h UV            | 8h UV | 16h UV | 24h UV |
| pH                             | 4.62      | 4.91  | 4.91             | 4.92  | 4.75   | 4.43   |
| EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) | 839       | 822.5 | 820              | 820.5 | 832    | 847    |
| COD (g/L)                      | 1.35      | 1.20  | 1.30             | 1.20  | 1.15   | 1.05   |
| Total phenols (mg/L)           | 8.13      | 5.45  | 10.40            | 8.53  | 0.48   | 0.46   |

This is in good agreement with the interpretation of the OMW attack  $\text{TiO}_2$  reported by da Silva Perez et al. (1998) and Machado et al. (2000) for various compounds: preferential

attack of the electron-rich aromatic and olefinic groups, and attack at a lower rate of aliphatic side chains and with carbohydrates.

### 3.2. Elemental analysis (CHON)

The elemental composition of OMW at various stages of treatment is presented in Table 2.

**Table 2.** Elemental composition of the OMW at the different stages of treatment

|       | Percent weight |               |                |               | Atomic ratio |       |       |      |      |
|-------|----------------|---------------|----------------|---------------|--------------|-------|-------|------|------|
|       | C              | H             | O              | N             | CHON         | Ash   | C/N   | C/H  | O/C  |
| -0.5h | 37.01<br>±0.08 | 4.79<br>±0.04 | 33.44<br>±0.19 | 1.59<br>±0.01 | 76.83        | 23.17 | 27.15 | 0.64 | 0.68 |
| 0h    | 34.47<br>±0.27 | 4.88<br>±0.02 | 35.74<br>±0.39 | 1.06<br>±0.08 | 76.15        | 23.85 | 37.82 | 0.59 | 0.78 |
| 4h    | 33.86<br>±0.11 | 4.79<br>±0.01 | 38.32<br>±0.29 | 1.04<br>±0.05 | 78.01        | 21.99 | 38.04 | 0.59 | 0.85 |
| UV    |                |               |                |               |              |       |       |      |      |
| 8h    | 34.06<br>±0.11 | 4.57<br>±0.03 | 35.73<br>±0.44 | 0.93<br>±0.01 | 75.29        | 24.71 | 42.65 | 0.62 | 0.79 |
| UV    |                |               |                |               |              |       |       |      |      |
| 16h   | 32.54<br>±0.19 | 4.39<br>±0.02 | 38.85<br>±0.20 | 1.18<br>±0.03 | 76.96        | 23.04 | 32.19 | 0.62 | 0.90 |
| UV    |                |               |                |               |              |       |       |      |      |
| 24h   | 31.52<br>±0.02 | 4.04<br>±0.01 | 39.00<br>±0.33 | 0.94<br>±0.01 | 75.5         | 24.5  | 39.31 | 0.65 | 0.93 |
| UV    |                |               |                |               |              |       |       |      |      |

The percentage of carbon, hydrogen and nitrogen decreased, while that of oxygen increased. This supports the notion of degradation by oxidation described above. The percentage of ash shows an overall slight increase, but irregularities of the phenomenon occurred and are most likely due to the OMW heterogeneity, probably at the molecular level.

Under the action of  $\text{TiO}_2$  alone, the C/N ratio increased, indicating a strong fall in the nitrogen level, which likely corresponds to the hydrolysis of the protein component. It continued to increase, but less rapidly, under UV for up to 8h then decreased. This means parallel oxidation of C at increasing levels. The O/C ratio increased regularly with time, clearly showing oxidation by  $\text{TiO}_2$  alone then by the association UV/ $\text{TiO}_2$ . Both C/N and O/C ratios confirm that there is a direct action by  $\text{TiO}_2$ , which is amplified under UV irradiation. The C/H ratio was more or less stable throughout the treatment, indicating that even after 24h of UV irradiation, there was little change in the structure of the undegraded molecules.

The Fictitious Atomic-Group Separation method (FAS) was applied to the above data. The results are presented in Table 3.

**Table 3.** Ratios between fictitious chemical groups and oxidation states of C versus the duration of treatment

|                          | -0.5h | 0h    | 4h UV | 8h UV | 16h UV | 24h UV |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| CH <sub>2</sub> O/Ctotal | 0.68  | 0.78  | 0.83  | 0.79  | 0.79   | 0.75   |
| Cfree/Ctotal             | 0.25  | 0.17  | 0.15  | 0.21  | 0.10   | 0.07   |
| Cfree/CH <sub>2</sub> O  | 0.37  | 0.22  | 0.18  | 0.27  | 0.13   | 0.09   |
| C <sup>x</sup>           | -0.15 | -0.11 | 0.04  | 0.00  | 0.22   | 0.36   |

The ratio CH<sub>2</sub>O/Ctotal rose sharply under the action of TiO<sub>2</sub> alone but there was then only a very slight increase between 0 and 4h of TiO<sub>2</sub> plus UV and the slight fluctuations above 4h were very close to stability. The state of hydration of C increased during the brief period of TiO<sub>2</sub> alone but remained practically stable thereafter.

The ratios Cfree/Ctotal and Cfree/CH<sub>2</sub>O showed the same general pattern and, as CH<sub>2</sub>O/Ctotal did not vary much, the variations of the first two ratios can be attributed to Cfree. The presence of TiO<sub>2</sub> alone therefore caused a decrease of Cfree, which continued steadily except for the 8h point. This means that the attack, initially strong and then slowing down, particularly involves the aromatic structures represented by the group -Cfree. This is in agreement with the findings of da Silva Perez et al. (1998).

The oxidation state of carbon C<sup>x</sup> increased during photocatalysis, confirming the oxidizing effect of the treatment, which here affected structures still present as macromolecules.

### 3.3. Ultraviolet-visible spectroscopy

The plots present the same overall pattern showing similarity between the chemical structures before and after treatment, and no UV-absorbent structures appear during treatment.

Similar results were reported by El Hajjouji et al. (2007) for OMW treated by aerobic biodegradation.

During the treatment, there was a decrease in absorption over the whole range of wavelengths studied, from 700 to 300 nm. Moreover, at the stages -0.5, 0 and 4 hours of irradiation, the spectra presented a shoulder, between 350 and 400 nm, which then disappeared progressively.

This has also been reported by El Hajjouji et al. (2007). Machado et al. (2000) stated that the wavelength range required for lignin degradation is generally of lower energy (between 300 and 400 nm) than for phenols (<300nm). This is due to the functional character of lignin with certain groups sensitizing the degradation of the phenolic units (Castellan et al.,

1990). Lignin, largely present in pulp mill effluent, is a natural polymer whose main structural units consist of phenolic compounds (Tanaka et al., 1999). Lignin degradation in the presence of  $\text{TiO}_2$  and UV light is due to the combined action of hydroxyl and superoxide radicals, the main reactive species generated in such a photocatalytic process in the presence of oxygen (Machado et al., 2000).

To study the absorbance variation, it was necessary to use a wavelength outside the area of influence of the shoulder. We chose to make the readings at  $\lambda = 330 \text{ nm}$ , where measurements can be made with greatest accuracy. The plots show that absorbance decreases under the effect of the treatment, slightly during the first 8 hours then a little faster. After 24 hours of irradiation, absorbance dropped by 57%, corresponding to the disappearance of the same % of coloured constituents. This can be considered with respect to the drop in COD reported above, which only reached 22% after 24h (see §3.1). The difference between the two decreases could be due to two factors:

- a) The formation of small colourless organic molecules which, at least temporarily, remain in the solution, for instance ethanol, glycerol and simple sugars which can be considered as degradation intermediates.
- b) The persistence, for varying periods of time, of only slightly coloured or colourless macromolecules relatively resistant to the UV/ $\text{TiO}_2$  attack, and hence likely to be carbohydrates, suggesting that they are pectins.

The regression of absorbance versus time is a straight line with  $R^2 = 0.99$ . It can therefore be assumed that the whole disappearance process of coloured OMW components is linear with time, and hence that extrapolation is possible beyond the duration of the actual experiment.

With the equation:  $y = - 0.0487 x + 2.1345$

a value of  $y = 0$  was reached for  $x = 43.82$ , i.e. total degradation of the coloured components after 44h of treatment.

The  $E_4/E_6$  ratio (absorbance at 465 nm/ absorbance at 665 nm) (Table 4) increased during treatment rising, from 6.01 at the initial stage to 7.09 after 24h irradiation. It increases with decreasing molecular weight and condensation and can serve as an index of humification (Stevenson, 1982). Thus, a high ratio reflects a low degree of aromatic condensation (Stevenson, 1982). In a rather exhaustive study Chen et al. (1977) concluded that  $E_4/E_6$  ratios of humic and fulvic acids were governed primarily by particle sizes and weights; secondary relationships were observed between the ratio and total acidity, the  $-\text{COOH}$  content and C and

O contents. The slow increase of the  $E_4/E_6$  ratio would then correspond to both a steady decrease of aromatic condensation and an increase in the proportion of acid groups, i.e. to the attack of aromatic structures.

**Table 4.**  $E_4/E_6$  ratio (absorbance at 465/absorbance at 665 nm) for treated OMW

|           | -0.5h | 0h   | 4h UV | 8h UV | 16h UV | 24h UV |
|-----------|-------|------|-------|-------|--------|--------|
| $E_4/E_6$ | 6.01  | 6.36 | 5.12  | 5.19  | 8.42   | 7.09   |

### 3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The interpretation is based on works of Tanaka et al. (1999); Ouattmane et al. (2000); Hafidi et al. (2005); El Hajjouji et al. (2007); and Smidt et al. (2006). The attribution of the absorption bands is summarised in Table 5.

**Table 4.** Absorbance bands from the IR spectra of treated OMW

| Wavelength                   | Assignments   |
|------------------------------|---|
| 3400 $\text{cm}^{-1}$        | -OH (phenols, alcohols and carboxylic groups)   |
| 2925 $\text{cm}^{-1}$        | C-H stretching in aliphatic structures (fatty acids, waxes and other long-chain structures)   |
| 1716 - 1740 $\text{cm}^{-1}$ | C=O stretching in carboxyls, acids and ketones.   |
| 1620 - 1660 $\text{cm}^{-1}$ | C=O stretching in amides I<br>C=O stretching in ketones, acids and/or quinones<br>C=C stretching in aromatics   |
| 1635 $\text{cm}^{-1}$        | C=C conjugates or aromatics   |
| 1450 - 1460 $\text{cm}^{-1}$ | C-H stretching in aliphatic structures  |
| 1400 - 1390 $\text{cm}^{-1}$ | OH deformation and C-O stretching in phenolic OH, C-H deformation of $\text{CH}_2$ and $\text{CH}_3$ groups, $\text{COO}^-$ antisymmetric stretching. |
| 900 - 1300 $\text{cm}^{-1}$  | C-H stretching and OH deformation in carboxyls, C-O of ethers on an aromatic ring and the N-H of amides II  |
| <1000 $\text{cm}^{-1}$       | stretching of aromatic ethers, polysaccharides (C-H stretching)   |

First impressions suggest a strong resemblance between the IR spectra of all the samples, irrespective of the duration of photocatalysis, which suggests a high level of similarity between large non-dialyzable molecules during treatment. However, a closer study, based on the ratios between the intensities of the peaks (measured in OD units) is presented in Table 6 and brings out some interesting differences.



All the ratios  $/3440\text{ cm}^{-1}$  underwent a clear decrease from 0 to 4h, then increased until 16h to fall again between 16 and 24h indicating opposing relative variations in the level of -OH groups.

**Table 6.** Ratios of IR absorption intensity (OD) of various peaks to absorption intensity at  $3440\text{ cm}^{-1}$  versus irradiation time.

|           | -0.5h | 0h   | 4h UV | 8h UV | 16h UV | 24h UV |
|-----------|-------|------|-------|-------|--------|--------|
| 619/3440  | 0.65  | 0.74 | 0.55  | 0.60  | 0.74   | 0.45   |
| 1076/3440 | 0.96  | 0.88 | 0.71  | 0.85  | 0.87   | 0.69   |
| 1400/3440 | 0.74  | 0.78 | 0.61  | 0.70  | 0.77   | 0.54   |
| 1635/3440 | 0.85  | 0.85 | 0.73  | 0.80  | 0.87   | 0.71   |
| 1733/3440 | 0.78  | 0.76 | 0.57  | 0.68  | 0.80   | 0.71   |
| 2925/3440 | 0.60  | 0.72 | 0.54  | 0.57  | 0.68   | 0.50   |

Considering the overall decrease of  $C_{\text{free}}/C_{\text{total}}$  (linked to aromatic compounds), the stability of  $\text{CH}_2\text{O}/C_{\text{total}}$  (linked to carbohydrates) and the patterns presented by the  $/3440$  curves, attack must occur first on the aromatic parts of the non-dialysing macromolecules, paralleled by much less severe attack of the hydroxyl moieties and maybe by intermediate hydroxylation reactions. Here again, the observations are in agreement with the mechanism proposed by the authors cited above.

But, in any case, the process does not occur in a regular manner. The FAS curves (Table 3) and the curves of the  $/3440$  ratios (Table 6) show irregularities which lead to a distinction being made between at least three successive phases: 0-4h, 4h-16h and 16h-24h during which the proportions of -OH successively rise, then fall then rise again. It can also be noted that in the UV linear regression plot, the points at 8h and 16h lie above the curve, indicating attack that is slower than average, while 4h and 24h are below, corresponding to faster attack. As the treatment actually received was perfectly constant, the existence of the three consecutive phases can only be accounted for by the occurrence of at least three different types of molecules in the OMW. This could correspond to three different combinations between the aromatic and pectin structures. The aromatic structures, more easily degraded by UV/ $\text{TiO}_2$  are responsible for the black colour of the OMW and, in the initial effluent, certain resemblance with humic substances. The pectins, which are colourless or almost colourless, are responsible for the resistance to treatment

#### **4. Conclusion**

Treatment with UV/TiO<sub>2</sub> for 24h primarily led to the disappearance of the great majority (94%) of the phenolic compounds – i.e. the compounds targeted by the technique. In addition, considering the mode of attack, the remaining 6% detected by Folin's reagent, are probably located at the surface of macromolecular structures and hence causing much less toxicity and/or pollution.

Also, the treatment degraded 57% of the coloured molecules and 22% of the compounds responsible for the chemical oxygen demand (COD), which appear to be mainly pectins.

The fine study of the results indicates the occurrence of three phases, which likely correspond to the presence of three categories of organic molecules, differing by their sensitivity to oxidation by the UV/TiO<sub>2</sub> system.

Olive mill wastewater has often been considered to be closely related to humic compounds because it is dark coloured, contains phenols and shares some of the properties of humic compounds. However, further studies of this effluent should pay greater heed to the presence of a high proportion of pectins.

#### **Acknowledgements**

This work was financially supported in part by an Eiffel grant from the French government. We thank S. Halladja, from the Université Blaise Pascal, Aubière, France, for her kind assistance in this work.

## References

- Al Mallah, K., Asma, O.J., Abu Lail, N.I., 2000. Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Separ. Purif. Technol.* 20, 225-234.
- Castellan, A., Colombo, N., Vanucci, C., Fournier de Violet, P., Bouas Laurent, H., 1990. A photochemical study of an O-methylated  $\alpha$ -carbonyl  $\beta$ -1 lignin model dimmer: 1,2 di (3'4'-dimethoxyphenyl) ethanone (deoxyveratroin). *J. Photochem. Photob.* 51, 451-467.
- Centi, G., Perathoner, S., Torre, T., Verduna, M.G., 2000. Catalytic wet oxidation with  $H_2O_2$  of carboxylic acids on homogeneous and heterogeneous Fenton type catalysts. *Catal. Today.* 55, 61-69.
- Chamkha, M., Patel, B.K.C., Garcia, J.L., Labat, M., 2001. Isolation of *Clostridium* biofermentants from oil mill wastewater converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of species. *Anaerobe.* 7, 189-197.
- Chang, C.N., Ma, Y.S., Fang, G.C., Chao, A.C., Tsai, M.C., Sung, H.F., 2004. Decolorizing of lignin wastewater using the photochemical UV/TiO<sub>2</sub> process. *Chemosphere.* 56, 1011-1017.
- Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M., 1977. Information provided on humic substances by E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, 352-358.
- da Silva Perez, D., Castellan, A., Grelier, S., Terrones, M.G.H., Machado, A.E.H., Ruggiero, R., Vilarinho, A.L., 1998. Photochemical bleaching of chemical pulps catalyzed by titanium dioxide. *J. Photochem. Photob.* 115, 73-80.
- Dias Albino, A., Bezerra, M., Nazaré, P.A., 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill waste water. *Biores. Technol.* 92, 7-13.
- El Hajjouji, H., Fakharedine, N., Ait Baddi, G., Winterton, P., Bailly, J.R., Revel, J.C., Hafidi, M., 2007. Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Biores. Technol.* 98, 3513-3520.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G., Lyberatos, G., 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Wat. Res.* 36, 4735-4744.
- Frank, S.N., Bard, A.J., 1977. Heterogeneous photocatalytic oxidation of cyanide and sulfite in aqueous solutions at semiconductor powders. *J. Phys. Chem.* 81, 1484-1488.

- Hafidi, M., Amir, S., Revel, J.C., 2005. Structural characterization of olive mill waste-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and  $^{13}\text{C}$  NMR. *Proc. Biochem.* 40, 2615-2622.
- Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., Bahnemann, D.W., 1995. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem. Rev.* 95, 69-96.
- Lanzalunga, O., Bietti, M., 2000. Photo-and radiation chemical induced degradation of lignin model compounds. *J. Photochem. Photob.* 56, 85-108.
- Machado, A.E.H., Furuyama, A.M., Falone, S.Z., Ruggiero, R., da Silva Perez, D., Castellan, A., 2000. Photocatalytic degradation of lignin models, using titanium dioxide: the role of the hydroxyl radical. *Chemosphere.* 40, 115-124.
- Macheix, J.J., Fleuriet, X.X., Billot, J.A., 1990. Fruit phenolics. CRC Press Inc, Boca Raton Florida, p.378.
- Ndira, V., 2006. Substances humiques du sol et du compost. Analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs : vers une approche thermodynamique. PhD thesis, Institut National Polytechnique, Toulouse, France, p. 274.
- Ollis, D.F., Al Ekabi, H., 1993. Photocatalytic purification and treatment of water and air, Elsevier.
- Ouatmane, A., Dorazio, V., Hafidi, M., Revel, J.C., Senesi, N., 2000. Elemental and spectroscopic characterization of humic acids fractionated by gel permeation chromatography. *Agronomie.* 20, 491-504.
- Ramos Cormenzana, A., Monteoliva Sanchez, M., Lopez, M.J., 1995. Bioremediation of alpechin. *Int. Biodeter. Biodeg.* 35, 249-268
- Rodier, J., 1971. L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau. Eds. Dunod, Paris.
- Rodier, J., 1987. L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 7ème édition, Dumond, Paris.
- Selli, E., Baglio, D., Montanarella, L., Bidoglio, G., 1999. Role of humic acids in the  $\text{TiO}_2$ -photocatalyzed degradation of tetrachloroethene in water. *Wat. Res.* 33, 1827-1836.
- Smidt, E., Meissl, K., 2006. The applicability of Fourier transforms infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management. *Waste Manag.* 27, 268-276.
- Stevenson, F.J., 1982. Extraction, fractionation and general chemical composition of soil organic matter. In: Stevenson, F.J. (Ed.), *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley, New York.

- Tabet, D., Saidi, M., Houari, M., Pichat, P., Khalaf, H., 2006. Fe-pillared clay as a Fenton-type heterogeneous catalyst for cinnamic acid degradation. *J. Env. Manag.* 80, 342-346.
- Tanaka, K., Calanag, R.C.R., Hisanaga, T., 1999. Photocatalyzed degradation of lignin on  $\text{TiO}_2$ . *J. Mol. Catal.* 138, 287-294.
- Tardy, Y., Bailly, J.R., Guiesse, M., Kaemmerer, M., Boutin, M.P., Revel, J.C., 2000. An approach for a thermodynamic treatment of the humic substances in soils and plants nutritional environment. *In: Proceedings of the International Humic Substances Society on Entering the Third Millennium with a common approach to Humic Substances and Organic Matter in Water, Soil and Sediment, Proceedings Vol.1.* France: Toulouse, p. 23-28.
- Tardy, Y., de Toledo, M.C.M., Bailly, J.R., Guiesse, M., Revel, J.C., 2005. Towards the thermodynamic treatment of humic substances in soils. *Revista do Instit. Geológico, São Paulo.* 26(1/2), 45-51.

## **Partie II.**

## **Mise en évidence de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive par le test des micronoyaux. Détoxification et valeur agronomique des ces effluents au cours du traitement aérobie**

Cette partie se compose de deux chapitres:

### **Chapitre 1 : Publication 5**

**EL HAJJOUJI H**, PINELLI E, GUIRESSE M, MERLINA G, REVEL J.-C, HAFIDI M. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 634, 25-31.

### **Chapitre 2:**

Détoxification et valeur agronomique des effluents d'huileries d'olive au cours du traitement aérobie.

## Chapitre 1.

### **Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test**

H. El Hajjouji <sup>a,b</sup>, E. Pinelli <sup>b,\*</sup>, M. Guiresse <sup>b</sup>, G. Merlina <sup>b</sup>, J.-C. Revel <sup>b</sup>,

M. Hafidi <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Ecologie Végétale, Sol et Environnement, Département de Biologie,  
Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP 2390, Marrakech, Maroc.

<sup>b</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, EcoLab, UMR 5245 CNRS-  
UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopole – BP 32607, Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-  
Tolosan, France.

**\* Corresponding author: [pinelli@ensat.fr](mailto:pinelli@ensat.fr)**



## Présentation

Le présent travail concerne l'étude de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive générés par une unité moderne de trituration d'olive à Marrakech. La technique utilisée est le test des micronoyaux. Il est basé sur la détection de micronoyaux dans les cellules des extrémités radiculaires d'une plante test (*Vicia faba* dans la présente étude) exposées aux substances présumées phytotoxiques. Les micronoyaux, visibles dans le cytoplasme des cellules, résultent d'une cassure chromosomique (effet de substances clastogènes) ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique (effet de poisons fusoriaux).

Cinq concentrations d'effluents d'huileries d'olive sont testées : 0.1; 1; 5; 10 et 20%. La solution de Hoagland est utilisée comme témoin négatif et l'hydrazide maléique comme témoin positif.

Les résultats montrent une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux dans les cellules de racines de *Vicia faba*, avec l'augmentation de la concentration des effluents d'huileries d'olive. Ces effluents deviennent génotoxiques à une concentration de 10%.

Pour la mise en évidence des molécules responsables de l'effet génotoxique, les six composés phénoliques identifiés par HPLC dans ces effluents sont testés à des concentrations correspondant à celles contenues dans les effluents d'huileries d'olive à 10%. Les composés testés sont : l'oleuropeine; l'acide gallique; l'acide 4-hydroxyphényl acétique; l'acide cafféique; l'acide paracoumarique et l'acide vératrique. Les résultats montrent que deux composés phénoliques parmi les six testés : l'acide gallique et l'oleuropeine induisent une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux par rapport au témoin négatif. Ceci nous permet de dire que, dans nos conditions expérimentales, la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive est liée à la présence d'oleuropeine et d'acide gallique.

**Abstract**

The present study concerns the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) generated in mills producing olive oil in Morocco. The *Vicia faba* micronuclei test was used to evaluate the genotoxicity of OMWW and the six major phenolic compounds identified by HPLC in this effluent. Five concentrations of OMWW were tested: 0.1; 1; 5; 10 and 20%. Maleic hydrazide was used as positive control. The results showed that OMWW was genotoxic at a 10% OMWW concentration. In order to investigate the molecules involved in this genotoxicity, the six major phenols (oleuropein; gallic acid; 4-hydroxyphenylacetic acid; caffeic acid; paracoumaric acid and veratric acid) present in this effluent were studied at the concentrations corresponding to the genotoxic concentration of the OMWW. Data showed that two phenols, Gallic acid and Oleuropein induced a significant increase in *Vicia faba* micronucleus frequency; the four other phenols had no significant genotoxic effect. These results suggest that in our experimental conditions, OMWW genotoxicity was associated to gallic acid and oleuropein.

**Keywords:** Olive mill waste water; genotoxicity; Micronucleus assay; *Vicia faba*; Phenolic compounds.

## 1. Introduction

Olive mill waste water (OMWW) can cause serious environmental hazards in olive producing countries, especially around the Mediterranean basin. It has been estimated that  $30.10^6$  m<sup>3</sup> are produced per year [1]. In Morocco, olive mills are one of the foremost polluters: the volume of OMWW produced annually is estimated at 180 000 m<sup>3</sup> during the season of production [2]. Most frequently, OMWW is pumped and discharged into evaporation ponds or directly dumped in rivers or spread on soil [3-4]. The result on the environment is negative, leading to a saturation of the spread soil, causing pollution of superficial groundwater and of the water table itself. This unfavourable effect of OMWW on the environment is exacerbated by their acidity and high contents in phenols. In addition, only few studies deal with analysis of phenols and identification in olive waste water.

It is well known that phenolic compounds are major contributors to the toxicity and the antibacterial activity of OMWW. They limit its microbial degradability [4-5]. Gallic acid reduced significantly larval growth of *S.frugiperda* neonates [6]. The application of dry olive mill residues decreased the dry weight of tomato and soybean plants due to its phenolic content [7]. Phenols in seeds have also been proposed as germination inhibitors [8]. The presence of phenols causes the inhibition of germination of *Atriplex Triangularis* and *Pinus laricio* seeds [9].

In addition, phenols exert some other toxic and genotoxic effects on animal and human cells. For example, the exposure of Syrian hamster embryo cells to phenol and catechol induces cell transformation, gene mutations, unscheduled DNA synthesis, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges [10]. In vitro studies conducted on human lymphocytes it was shown that catechol and phenol significantly induced the formation of micronuclei and also increased the number of kinetochore-positive micronucleated cells [11].

However, phenolic compounds possess strong antioxidant properties [12], which may turn the olive oil residues into an affordable source of natural antioxidant. They may also play a major role in preventing chronic human diseases [13]. Many phenolic compounds e.g. caffeic acid, tyrosol and 4-hydroxybenzoic acid are well known precursors in pharmaceutical, chemical and food industries [14].

*Vicia faba* has been used for evaluating chromosomal aberrations since the early 1920s [15-16]. In addition, the detection of micronucleus in *Vicia* root tips has been more recently developed to evaluate the genotoxicity of some different matrix, including water [17], soils [16-18], waste water and industrial effluent [19]. No study however has been conducted to test potentially polluted OMWW with this method. In the present work, the *Vicia* root-micronucleus

assays were selected to assess genotoxicity induced by different concentrations of raw OMWW and the six major phenols found in this effluent in order to identify the genotoxic compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Origin of olive mill waste water

Olive mill waste water (OMWW) was collected at the outlet of a 3-phase centrifugation plant located in Marrakech (Morocco). It was transported in 5-litre bottles and refrigerated at 4°C until required for analysis and plant exposition.

### 2.2. Physico-chemical analysis

The main physico-chemical characteristics of raw OMWW were reported in table1.

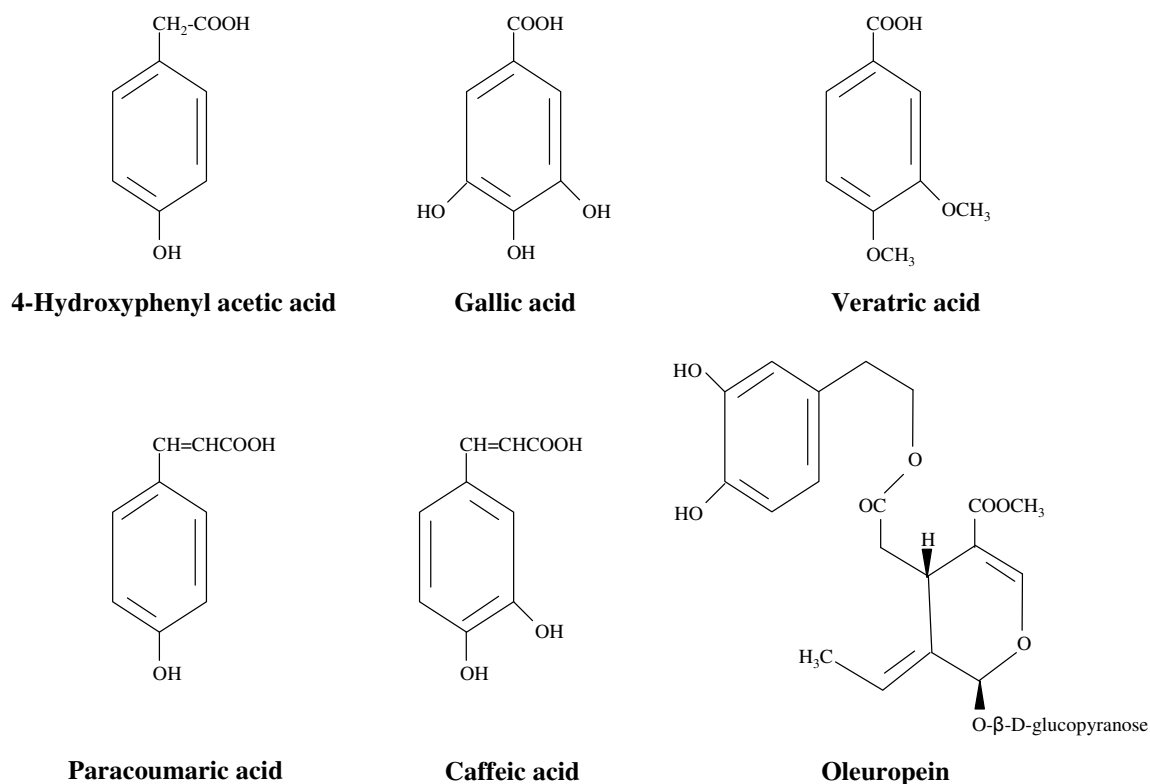
**Table 1.** Composition of raw OMWW

| Parameters                         | Values        |
|------------------------------------|---------------|
| pH                                 | 4.8 ± 0.01    |
| Electrical conductivity (ms/cm)    | 44.3 ± 0.2    |
| Dry matter (g/L)                   | 168.93 ± 7.38 |
| Organic matter (g/L)               | 129.93 ± 6.72 |
| Ashes (g/L)                        | 39 ± 0.71     |
| Total phenols (mg/L)               | 970 ± 8.64    |
| Chemical Oxygen Demand (COD) (g/L) | 135 ± 4       |
| Na <sup>+</sup> (g/L)              | 2.10          |
| Cl <sup>-</sup> (mg/L)             | 954.55        |

The pH and the electrical conductivity were measured at ambient temperature following the recommendations of Rodier [20]. The dry matter was measured by drying it at 105°C for 24 hours and the organic matter was weighed by determining the loss-on ignition at 550°C for 24 hours. The phenolic compounds were extracted using the method of Macheix et al. [21]. The extraction was carried out with methanol (80%) in the presence of phosphoric acid and ammonium sulphate. The phenols were assayed using Folin-Ciocalteu reagent [22]. The chemical oxygen demand (COD) was determined according to Rodier [23]. Concentration of sodium and chloride were respectively determined by ion chromatography with a Dionex high-pressure liquid ionic chromatograph DX-100 (Ionpac CS-12A and AS4A-SC, Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA).

### 2.3. Characterization of phenols by HPLC

Analytical HPLC was conducted on a Hewlett-Packard (HP) 1100 liquid chromatograph, fitted with a PRP-1 reverse-phase column (Hamilton). Phenolic compounds were detected with a UV diode-array detector (HP 1110) set at 280, 320 and 350 nm. 1  $\mu$ L of phenolic compounds extracts of OMWW were injected into the HPLC. The best resolution was found using an elution gradient with a constant flow rate of 1 mL/min and a mobile phase consisting of a mixture of Acetonitrile 5% (A) and distilled water 90% (B) at pH 2.6 adjusted with orthophosphoric acid. The mobile phase composition started at 5% of solvent A and 95% of solvent B for 5 minutes, followed by a linear increase of solvent A to 80% and a decrease of solvent B to 20% for 65 minutes and the initial conditions were reached again 70 minutes after the start. The phenolic compounds were identified by their retention times in comparison with commercial standards (oleuropein, gallic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, caffeic acid, paracoumaric acid, and veratric acid). The chemical structures of these phenols are presented in figure 1.



**Figure 1.** Chemical structures of the studied phenols.

## 2.4. Micronucleus test

Seeds of *Vicia faba* that had been stored at 4°C were used for this study. The Vicia test was carried out according to Knassmüller et al. [18], Ma et al. [24], and in a normalized method [25]. Dry seeds of *Vicia faba* were soaked for 24 hours in deionised water, the seed coats were removed and the seedlings were allowed to germinate between two layers of moist cotton. After 3 days, the primary roots at about 2-3 cm in length were suspended in Hoagland's solution and their tips cut off in order to let the secondary roots grow. Four days were necessary to obtain secondary roots of suitable length (1-2 cm) for the test. Exposure time was 30 hours for the negative control and 6 hours for the treated groups followed by a 24 hours recovery period. Five different concentrations of OMWW were tested (0.1%, 1%, 5%, 10% and 20% v/v). The six major phenols identified in the OMWW (oleuropein, gallic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, caffeic acid, paracoumaric acid, and veratric acid) were tested. For each phenol, the final concentration used corresponds to its respective concentration in the 10% OMWW (Table 2).

**Table 2.** Phenols concentrations analysis in raw and 10% dilution of OMWW

| Phenols                          | Raw OMWW<br>( $\mu\text{M}$ ) | 10% OMWW<br>( $\mu\text{M}$ ) |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 4-Hydroxyphenyl acetic acid (HA) | 3086.4                        | 308.6                         |
| Veratric acid (VA)               | 1762.4                        | 176.2                         |
| Paracoumaric acid (PA)           | 572.2                         | 57.2                          |
| Gallic acid (GA)                 | 361.1                         | 36.1                          |
| Oleuropein (OI)                  | 56.7                          | 5.7                           |
| Caffeic acid (CA)                | 31.9                          | 3.2                           |

For each experiment five seeds were used per treatment. Maleic hydrazide (40  $\mu\text{M}$ ) was used as positive control. Aerated Hoagland's solution was used as negative control. After treatment, root tips were fixed in Carnoy's solution (glacial acetic acid/ethanol 1:3) at 4°C for one night. They were transferred into 70% ethanol for storage. They were then hydrolyzed in 1 N HCl at 60°C for 5-7 min. Five slides were prepared for each of the five seeds. After staining the root tips with 1% aceto-orcein, the interphase cells (as defined by Ma et al. [24]) were scored for micronuclei frequencies under a 1000 X magnification. Five thousand cells per tip were counted.

In order to avoid underestimation of micronuclei frequency due to impaired cell proliferation rate, the micronucleus test was performed only on root tips with a mitotic index superior to 2 % [26].

### 2.5. Statistical analysis

A statistical analysis was performed on the collected data. The mean value of the negative and positive controls and the OMWW groups was obtained from descriptive analysis, and One ANOVA Way test was conducted to obtain F values and MS errors. Tukey's test [27] was used to determine the level of significance against the negative and the positive control values in each experimental series.

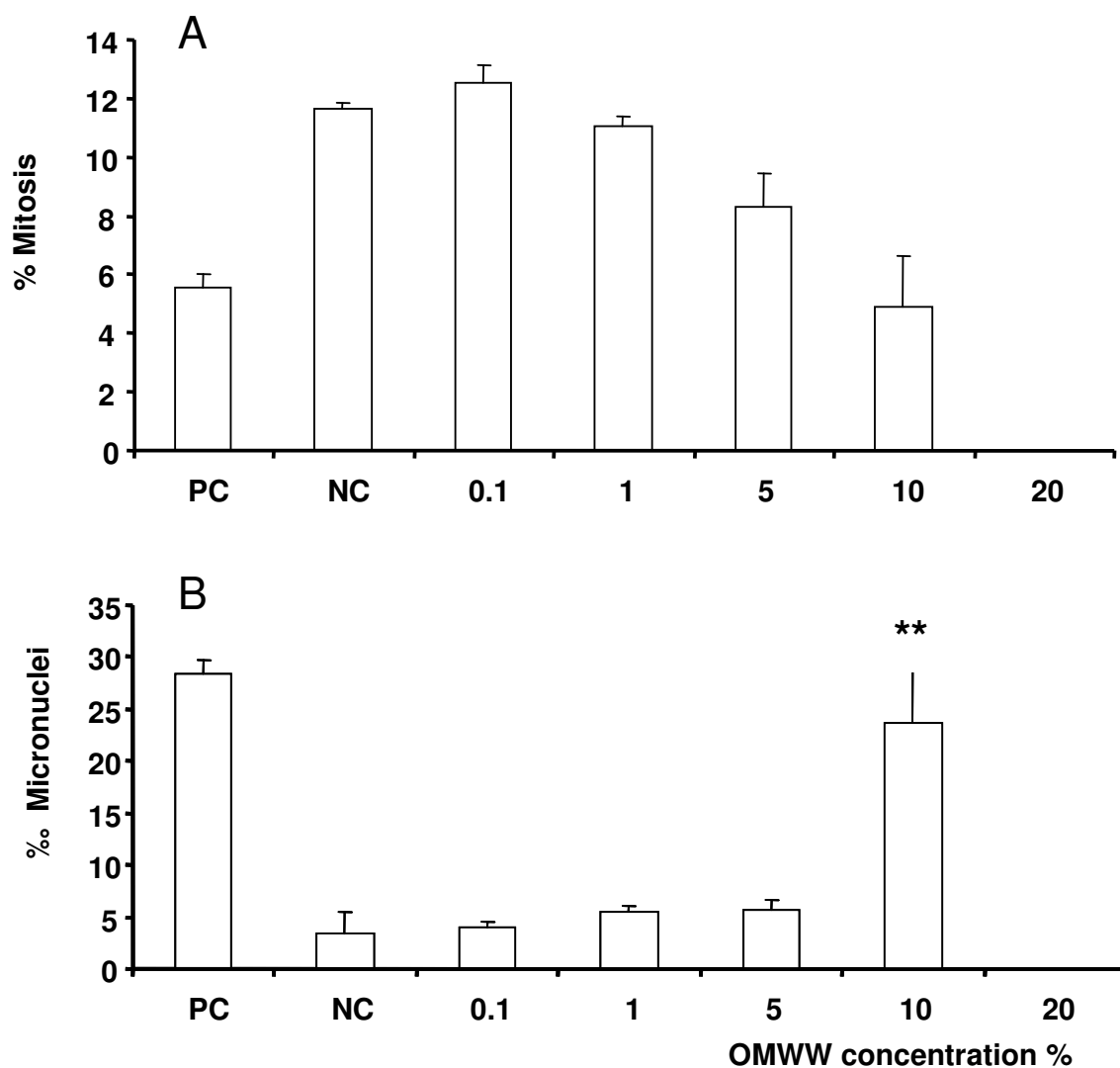
## 3. Results

### 3.1. Characterisation of phenols by HPLC

The use of HPLC to study the phenolic compounds in raw OMWW revealed the presence of 36 compounds (data not shown). Only 6 of the major phenolic compounds present in the OMWW were identified in comparison with commercial standards (Table 2). The 4-Hydroxyphenyl acetic acid (HA) and Veratric acid (VA) were present at high concentrations of respectively 3086.4 and 1762.4  $\mu\text{M}$ . Paracoumaric acid (PA) and Gallic acid (GA) were present at concentrations of respectively 572.2 and 361.1  $\mu\text{M}$  and Oleuropein (Ol) and Caffeic acid (CA) were present at low concentrations of respectively 56.7 and 31.9  $\mu\text{M}$ .

### 3.2. Micronucleus test of OMWW

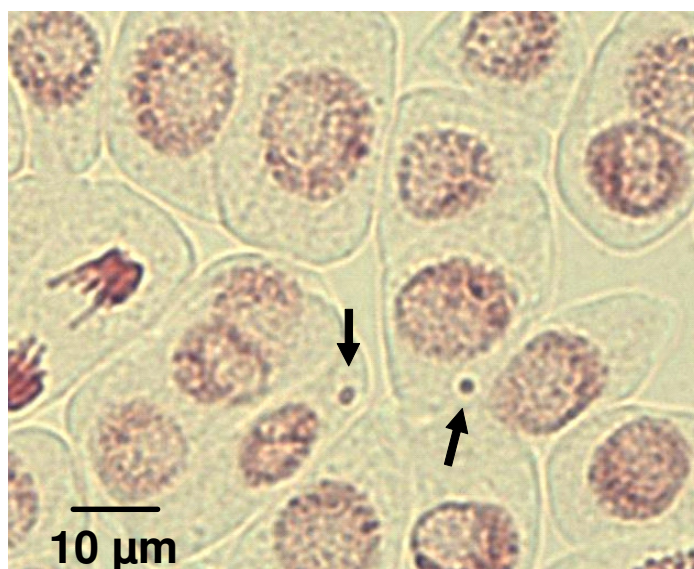
The results of the *Vicia faba*-root-micronucleus test on five concentrations of OMWW samples collected in an olive oil producing factory are presented in figure 2. For concentration of OMWW superior to 10%, a blackening of the root tips appeared and a loss of mitosis was observed (figure 2A). In these conditions the quantification of micronuclei was impossible. For low concentrations of OMWW from 0.1 to 5%, no significant difference in micronucleus frequencies was recorded (figure 2B). A significant increase in micronucleus frequency was observed in *Vicia faba* roots exposed to 10% OMWW.



**Figure 2.** Mitotic index (A) and micronucleus frequency (B) values in *Vicia faba*-root exposed to different OMWW concentrations (0.1%; 1%; 5%; 10% and 20%). PC: positive control; NC: negative control. \*\*  $p < 0.001$  against the NC.



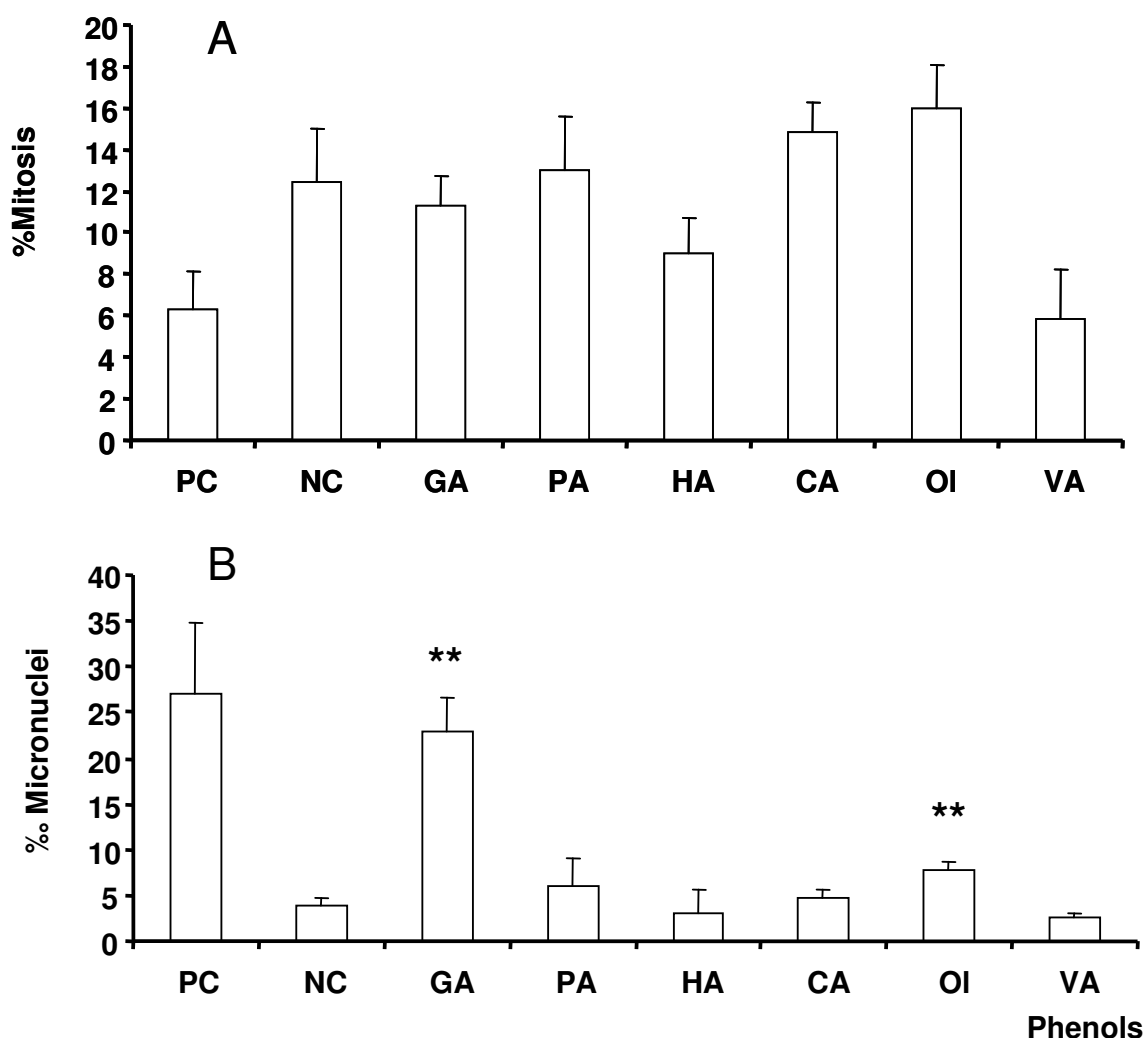
A digital picture of the micronuclei induced by OMWW was presented in figure 3. In these conditions, the number of micronuclei was not significantly different from the positive control and underlines the genotoxic potential of this effluent. In order to investigate the molecules involved in this genotoxicity, the six major phenols present in this effluent were studied at concentrations corresponding to the maximum genotoxic effect of the OMWW (10%).



**Figure 3.** Micronuclei induced by OMWW in *Vicia faba* cell roots. Micronuclei are marked with arrow.

### 3.3. Micronucleus test of phenols

The data in figure 4 show the effect of the six phenols tested at concentrations corresponding to those observed in 10% OMWW (Table 2). For all the phenols tested separately, the mitotic index ranged between 2 and 17 %. Data show that excepting GA and OL, the four other phenols did not induce significant genotoxicity. GA induced a strong increased of micronucleus frequency, 7.5 as high as the negative control and not significantly different from the positive control ( $27\% \pm 7.7$ ). OL significantly increased the micronucleus frequency which was twice as high as the negative control, but 3.5 times lower than the positive control.



**Figure 4.** Mitotic index (A) and micronucleus frequency (B) values in *Vicia faba*-root exposed to different phenols concentrations.

PC: positive control; NC: negative control; HA: 4-Hydroxyphenyl acetic acid; VA: Veratric acid; PA: Paracoumaric acid; GA: Gallic acid; OI: Oleuropein; CA: Caffeic acid. \*\*  $p < 0.001$  against the NC.

#### 4. Discussion

In the present study, the *Vicia faba* micronucleus (MN) test which detects chromosomal breakage and aneuploidy was employed in order to evaluate the genotoxic potential of OMWW. It is now well established that OMWW is toxic for bacteria, aquatic organisms and plants [28]. The results of figure 2 illustrate this toxicity, because at a concentration of 20% of OMWW in Hoagland's solution, a blackening of the root tips and a loss of mitosis was observed. Microscopic observations revealed necrotic cells and disorders in root tip tissues (data not

shown). Further physico-chemical characteristics of OMWW contribute to these toxic effects. OMWW contains nitrogenous compounds, polyphenols, volatile acids and polyalcohols [29]. The concentration of phenols which reached-up to 900 mg/L could also have contributed to the high toxicity of the OMWW. At lower concentrations, less than 20%, the toxicity disappeared; the number of mitosis became normal. In these conditions, the 10% OMWW concentration induced a significantly higher *Vicia faba* MN frequency than that of the negative control. These data illustrated the genotoxic potential of the OMWW. At lower concentrations, the genotoxicity disappeared. The *Vicia faba* MN test is a very sensitive and useful method that can allow the detection of both clastogenic and aneugenic effects [30]. Micronuclei are the results of chromosome breaks (or mitotic anomalies) that require a passage through mitosis to be recognisable. The molecular mechanism of DNA breakdowns is not yet clearly understood. Although it does not constitute the only genotoxic pathway, the oxidative stress was largely described to be implied in the DNA damages [31]. Because phenolic compounds are important organic products in OMWW and they can promote oxidative stress [32], the present study was focused on these molecules.

In the literature, no study has described the genotoxic effect of phenols in plants. However, many studies on different culture cell lines [11-33] or by using the Ames test demonstrated the genotoxic potential of some phenols. In this work, two phenols, Gallic acid (GA) and Oleuropein (OI) induced a significant increase in MN frequency, whereas 4-Hydroxyphenyl acetic acid (HA), Veratric acid (VA), Paracoumaric acid (PA) and Caffeic acid (CA) had no genotoxic effect. It has been demonstrated that phenolic compounds can spontaneously oxidise at pH above neutrality, giving rise to the superoxide anion [34] and semiquinone intermediates [32]. The superoxide anion produced can initiate a free-radical chain reaction with the simultaneous production of other reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide and hydroxyl radical. The hydroxyl radical is the ultimate reactive oxygen species that interacts with DNA and promotes genetic damage.

In previous studies, Tayama and Nakagawa. [35] demonstrated that GA autoxidation was accompanied by the production of active oxygen species. In yeast, the genotoxicity of GA increases when autoxidation is accelerated [36]. Duarte et al. [37] showed that several phenolic compounds present in roasted coffee (caffeic acid, catechol, pyrogallol and chlorogenic acid), in presence of  $\text{Fe}^{3+}$ /EDTA, show an ability to promote the degradation of deoxyribose, especially at pH values above neutrality. This activity was mediated by hydrogen peroxide since it was inhibited by catalase. In the same way, Jacobi et al. [38] reported that propyl gallate damages DNA synergistically with Cu (II) and they postulated that the effect was due to reactive oxygen

species produced as a result of redox reaction between propyl gallate and Copper. In our experimental conditions, the pH value was slightly acid, around 6.5 in all the experiments and Hoagformation generated from  $H_2O_2$  by Fenton reaction [39]. Do Céu Silva et al. [32] observed that catechol and pyrogallol showed a clear clastogenic effect in a pH dependent way. At pH 6, only pyrogallol at high concentration significantly increased the level of chromosomal aberration in V79 cells. These results could partly explain the difference in phenolic effects in *Vicia faba* MN assay. The genotoxicity of phenolic compounds could depend on (i) their concentrations (which are different in all the experiments), (ii) the pH of the culture medium and (iii) the presence of metal ions (particularly Fe and Cu). The concentration of caffeic acids in our experiments was particularly low in regards to the doses used in the literature.

Some studies noted the antioxidant potential of olive phenols [40-41]. On the basis of *in vitro* antioxidant activity, Roche et al. [42] demonstrated that Ol emerge as the stronger olive antioxidants (more than hydroxytyrosol and caffeic acid) in agreement with the ranking provided by the DPPH scavenging test in methanol. Babish and Visioli. [13] studied the cytotoxicity of Ol on human gingival fibroblast in culture. They found that Ol toxicity was higher than caffeic acid and coumaric acid. The authors suggested that the toxicity of these molecules should also be associated with the formation of  $H_2O_2$  in the cell culture media. An adverse effect of Ol was also supported by Nousis et al. [33]. In search for compounds able to protect nuclear DNA in cells exposed to oxidative stress by using the COMET assay in Jurkat cells, these authors demonstrated the capacity of olive oil extracts and OMWW to prevent, at low concentrations, hydrogen peroxide-induced formation of single strand breaks in the nuclear DNA. They also demonstrated that at higher concentrations, these products were also able to induce DNA damage by themselves. In addition, they found that in the same experimental system, Ol exerted a genotoxic effect while hydroxytyrosol and CA had a protective one. These contradictory results illustrated the ambivalence of all these phenols, which in function with the different experimental conditions exhibited different effects.

Finally, *Vicia faba* MN test seems to confirm the genotoxicity *in vivo* of two natural products GA and Ol. These results suggest that in spite of the similarity of structure between the different molecules studied, the effects are different. Do Céu Silva et al. [32] suggested that the mechanisms of genotoxicity are dependent on the structural feature of the molecules, since phenol is not genotoxic, the compounds with two OH groups showed lower genotoxic activity than pyrogallol with three OH groups. With three OH groups, GA is very similar to pyrogallol and exhibits in our experimental conditions an important genotoxic effect, equivalent to the

positive control (maleic hydrazid). Further work is now necessary to determine the *in vivo* mechanism of genotoxicity of these two phenols in *Vicia faba* root tips.

### **Acknowledgements**

This work was financially supported in part by an Eiffel grant from the French government. The authors wish to thank Mrs Anne Marie Alibert for her helpful criticisms of the English version of the manuscript.

## References

- [1] T. Merchichi, S. Sayadi. Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewater, *Proc. Biochem.* 40 (2005) 139–145.
- [2] B. EL Alami. Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. Mémoire de 3ème cycle, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc, 2000.
- [3] G. Greco JR, G. Toscano, M. Cioffi, L. Gianfreda, F. Sannino. Dephenolisation of olive mill waste water by olive husk, *Wat. Res.* 33 (1999) 3046-3050.
- [4] I. Fki, N. Allouche, S. Sayadi. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenol acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants, *Food Chem.* 93 (2005) 197-204.
- [5] R. Capasso, A. Evidente, L. Schivo, G. Orru, M.A. Marciallis, G. Cristinzio. Antibacterial polyphenols from olive mill waste water, *J. Appl. Bacteriol.* 79 (1995) 393-398.
- [6] A. Urrea Bulla, M. Suárez M, B. Moreno Murillo. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*, *Fitoterapia.* 75 (2004) 392-394.
- [7] I. Samperdro, E. Aranda, J. Martin, J.M. Garcia Garrido, I. Garcia Romero, J.A. Ocampo. Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues, *Appl. Soil Ecol.* 26 (2004) 149-156.
- [8] M. Ajmal Khan, I.A. Ungar. Inhibition of germination in *Atriplex Triangularis* seeds by application phenols and reversal ok inhibition by growth regulators, *Bot. Gaz.* 147 (Suppl. 2) (1986) 148-151.
- [9] A. Muscolo, M.R. Panuccio, M. Sidari. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils, *Plant Growth Regul.* 35 (2001) 31-35.
- [10] T. Tsutsui, N. Hayashi, H. Maizumi, J. Huff, J.C. Barret. Benzene-, catechol-, hydroquinone-, and phenol-induced transformation, gene mutations, chromosomal aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA sybthesis in Syrian Hamter embryo cells, *Mutat. Res.* 373 (1997) 113-123.
- [11] J.W. Yager, D.A. Eastmond, M.L. Robertson, W.M. Paradisin, M.T. Smith. Charaterization of micronuclei in human lymphocytes by benzene metabolites, *Cancer Res.* 90 (1990) 393-399.

- [12] V. Visioli, A. Romani, N. Mulinacci, S. Zarini, D. Conte, F. Vincieiri, C. Galli. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste water, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 3397-3401.
- [13] I.M. Babich, F. Visioli. In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil, Il Farmaco. 58 (2003) 403-407.
- [14] G. Knupp, G. Rücker, A. Ramos Cormenzana, S. Garrido Hoyos, M. Neugebauer, T. Ossenkop. Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill waste water, Int. Biodeter. Biodegrad. 38 (1996) 277-282.
- [15] N. Kanaya, B.S. Gill, I.S. Grover, A. Murtin, R. Osiecka, S.S. Sandhu, H.C. Andersson. *Vicia faba* chromosomal aberration assay, Mutat. Res. 310 (1994) 231- 247.
- [16] S. Cotelle, J.F. Masferaud, J.F. Réard. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium* / *Vicia*- micronucleus and the Tradescantia-micronucleus assays, Mutat. Res. 426 (1999) 167-171.
- [17] C.Q. Duan, B. Hu, X.H. Jiang, C.H. Wen, Z. Wang, Y.X. Wang. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test, Mutat. Res. 426 (1999) 121-125.
- [18] S. Knasmüller, E. Gottmann, H. Steinkellner, A. Fomin, C. Pickl, A. Paschke, R. Göd, M. Kundi. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays, Mutat. Res. 420 (1998) 37-48.
- [19] V. Thangapandian, M. Sophia, K. Swaminathan. Cytological effect of tannery effluents on root meristems of *Allium cepa* Linn test system, J. Environ. Biol. 16 (1995) 67-70.
- [20] J. Rodier. L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau. Ed-DUNOD, Paris, 1971.
- [21] J.J. Macheix, X.X. Fleuriet, J.A. Billot. Fruit phenolics. CRC press Inc, Boca Raton Florida, 1990, pp. 378.
- [22] R.A. Vasquez Roncero, C.E. Graciani Constante, D.R. Maestroduran. Componentes fenolicos de la aceituna. I- polifenoles de la pulpa, Grasas y Aceites. 25 (1974) 269-279.
- [23] J. Rodier. L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 7ème éd. Dumond, Paris, 1987.
- [24] T.H. Ma, Z. Xu, C. Xu, H. McConnell, E.V. Rabago, G.A. Arreola, H. Zhang. The improved *Allium* / *Vicia* root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants, Mutat. Res. 334 (1995) 185-195.

- [25] AFNOR. Qualité de l'eau- Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs- Evaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines de *Vicia faba*, AFNOR T95 EN 387, Saint-Denis, 2003.
- [26] S. Minissi, E. Lombi. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments, Mutat. Res. 393 (1997) 17-21.
- [27] G. Keppel. Design and analysis: a researcher's hand book, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1973, pp. 658.
- [28] A. Fiorentino, A. Gentili, M. Isidori, P. Monaco, A. Nardelli, A. Parrella, F. Temussi. Environmental Effects Caused by Olive Mill Wastewater: Toxicity Comparison of Low-Molecular-Weight Phenol Components, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1005-1009.
- [29] E. Moreno, J. Pérez, A. Ramos Cormenzana, J. Martínez. Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste, Mikrobios. 51 (1987) 169-174.
- [30] K. Al Sabti, C.D. Met calfe. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, Mutat. Res. 343 (1995) 121-135.
- [31] B. Halliwell. How to characterize a biological antioxidant, Free Radical Res. Communic. 9 (1990) 1-32.
- [32] M. Do Céu Silva, J. Gaspar, I. Duarte Silva, D. Leao, J. Rueff. Induction of chromosomal aberrations by phenolic compounds: possible role of reactive oxygen species, Mutat. Res. 540 (2003) 29-42.
- [33] L. Nosis, P.T. Doulias, N. Aligiannis, D. Bazios, A. Agalias, D. Galaris, S. Mitakou. DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide, Free Radical Res. 39 (2005) 787-795.
- [34] R. Snyder, C. Chedli. An overview of benzene metabolism, Environ. Health Perspect. 104 (Suppl. 6) (1997) 1165-1171.
- [35] S. Tayama, Y. Nakagawa. Cytogenetic effects of propyl gallate in CHO-K1 cells, Mutat. Res. 498 (2001) 117-127.
- [36] M.P. Rosin. The influence of pH on the convertogenic activity of plant phenolics, Mutat. Res. 135 (1984) 109-113.
- [37] M.P. Duarte, A. Laires, J. Gaspar, D. Leão, J.S. Oliveira, J. Rueff. Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds, Mutat. Res. 442 (1999) 43-51.



- [38] H. Jacobi, B. Eiche, I. Witte. DNA stand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper (II), *Free Rad. Biol. Med.* 24 (1998) 972-978.
- [39] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts, *Arch. Biochem. Biophys.* 246 (1986) 501-514.
- [40] E. Miro Casas, M.I. Covas, M. Farre, M. Fito, J. Ortuño, T. Weinbrenner, P. Roset, R. de la Torre. Hydroxytyrosol Disposition in Humans, *Clin. Chem.* 49 (2003) 945-952.
- [41] R. Leenen, A.J.C.R. Roodenburg, M.N. Vissers, J.A.E. Schurbiers, K.P.A. Van Putte, S.A. Wiseman, F.H.M.M. Van de Put. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: Influence on LDL oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1290-1297.
- [42] M. Roche, C. Dufour, N. Mora, O. Dangles. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 423-430

## **Chapitre 2.**

### **Détoxication et valeur agronomique des effluents d'huileries d'olive au cours du traitement aérobie**

## 1. Introduction

L'activité humaine est à l'origine d'une partie importante de la pollution de l'environnement et des écosystèmes. Il est donc important d'essayer d'évaluer les risques écotoxicologiques que représente l'épandage de ces différents polluants produits, sources de contamination. Le caractère génotoxique des polluants pourrait constituer la composante majeure de la toxicité à long terme, c'est-à-dire des perturbations lentes mais irrémédiables (mutations somatiques, aberrations chromosomiques, formation de micronoyaux), dues à une exposition prolongée des populations à des contaminations, même à de très faibles niveaux (Chenon, 2001). Ces polluants affectent les individus ou leurs descendances en modifiant le patrimoine génétique des espèces. Ce qui pourrait avoir un impact sur la reproduction, le développement des populations ainsi que sur leur biodiversité en affectant des gènes essentiels (Cecchi, 2004).

L'oléiculture représente une des plus anciennes activités agricoles dans le bassin méditerranéen. Toutefois, elle présente l'inconvénient de générer d'énormes quantités de déchets liquides dont la fraction organique complexe leur confère un pouvoir fortement polluantes (Fiorentino et al., 2003).

La connaissance des risques associés au travers de l'épandage des effluents d'huileries d'olive en agriculture est nécessaire pour prévenir les risques de pollution des sols agricoles. Il est possible et souhaitable de réaliser des tests de génotoxicité, c'est-à-dire la détection de la capacité d'une substance ou d'un processus physique à générer des dommages sur le matériel génétique. En effet, les agents génotoxiques ont le pouvoir d'altérer le génome des être vivants ou de perturber son fonctionnement mais ne sont pas toujours détectés par l'analyse chimique (AFNOR, 2003). Le test de numérotation des micronoyaux a été proposé comme marqueur biologique d'effets génotoxiques par Knasmüller et al. (1998), il a été utilisé par plusieurs auteurs pour évaluer la génotoxicité dans l'eau, le sol et dans les effluents industriels (Knasmüller et al., 1998; Cotelle et al., 1999 ; Duan et al., 1999; El Hajjouji et al., 2007). Il est basé sur la détection de micronoyaux dans les cellules des extrémités radiculaires de *Vicia faba* exposées aux substances présumées phytotoxiques.

Les végétaux supérieurs sont de bons systèmes génétiques pour évaluer et surveiller les polluants environnementaux (Minissi et al., 1997). La plante utilisée pour cet essai *Vicia faba* est sélectionnée pour sa grande sensibilité vis-à-vis des polluants et pour sa facilité d'obtention. Dans la présente étude, un essai agronomique et un test de génotoxicité ont été effectués sur les plants de *Vicia faba* exposés aux effluents d'huileries d'olive traités par un bioprocédé aérobie pour s'assurer de la disparition de la phytotoxicité et de la génotoxicité des effluents après traitement.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Essai de traitement des effluents d'huileries d'olive

L'effluent d'huileries d'olive est prélevé dans une unité moderne de trituration d'olives par centrifugation à trois phases de la région de Marrakech. Il est mis dans un récipient en verre aéré avec un flux d'air en continue à température ambiante, soit 25°C, pendant 45 jours. Du nitrate d'ammonium  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  est apporté pour amener le rapport C/N à 48.08 (valeur initiale=68.77) et un apport de chaux  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  permet de relever le pH à 6.18 (valeur initiale=4.9). Les caractéristiques physico-chimiques de ces effluents avant et après traitement sont représentées dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques des effluents d'huileries d'olive au stade initial et final du traitement.

| Paramètres                    | Stade initial | Stade final |
|-------------------------------|---------------|-------------|
| pH                            | 6.18          | 5.69        |
| Humidité %                    | 80.93         | 64.33       |
| Carbone Organique Total %     | 50            | 35          |
| Azote Kjeldahl Total %        | 1.04          | 1.30        |
| C/N                           | 48.08         | 27          |
| Demande chimique en oxygène % | 104.95        | 99.87       |
| Phénols totaux %              | 0.46          | 0.11        |

On note une diminution du carbone total et du rapport C/N. L'abattement de la demande chimique en oxygène reste faible mais celui des phénols totaux dépasse 75 %.

### 2.2. Essai agronomique

Les essais sont conduits en salle de culture dans des pots contenant 1 kg de sol argileux, tamisé à 2 mm. Les pots sont ramenés à la capacité au champ avec de l'eau distillée. Le semis est effectué à raison de 1 graine/pot de *Vicia faba* ensemencée à quelques centimètres de la surface du sol (Chaminade, 1960). Les effluents d'huileries d'olive sont épandus à des doses équivalentes à 5, 10 et 20 tonnes/hectares en tenant-compte de la densité apparente du sol d'environ 1.6. L'irrigation des pots est effectuée en fonction des besoins (2/3 de la capacité au champ) avec de l'eau distillée.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque dose. Après 2 mois de culture, l'essai est arrêté et la matière sèche aérienne et racinaire des plants de *Vicia faba* est déterminée après passage à l'étuve à 60°C jusqu'à poids constant. Les pesées de la matière végétale séchée permettent l'estimation de la production végétale de *Vicia faba* (en g poids secs/pot).

Un témoin (sans addition d'effluents d'huileries d'olive) est conduit dans les mêmes conditions. Ainsi qu'un essai NPK avec les apports suivant en pré-semi :

- L'équivalent de 240 kg/ha d'azote élément sous forme de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

- L'équivalent de 480 kg/ha de phosphore élément sous forme de  $K_2HPO_4$ .
- L'équivalent de 480 kg/ha de potassium élément sous forme de  $K_2HPO_4$ .

### 2.3. Test de génotoxicité

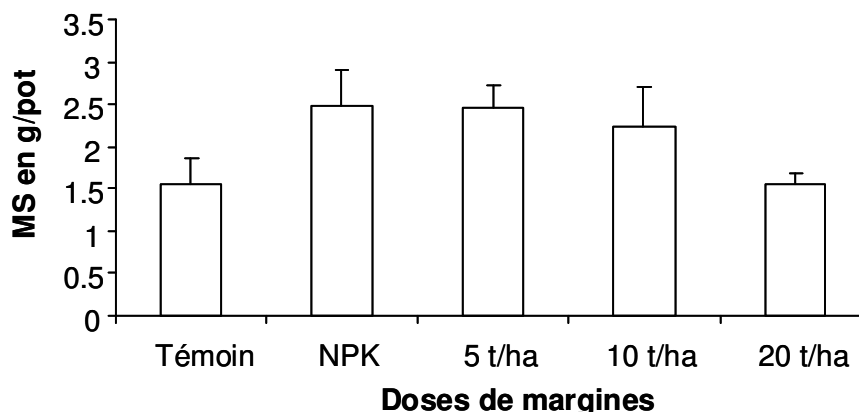
Les graines de *Vicia faba*, conservées à l'obscurité en chambre froide à 4°C, sont réhydratées en les immergeant 24 heures dans de l'eau, à température ambiante. Elles sont ensuite écossées, désinfectées à l'hypochlorite de calcium à 1% pendant 15 minutes puis rincées à l'eau déminéralisée et mises à germer à l'obscurité à 24°C dans une atmosphère à 100% d'humidité pendant 3 jours. Les apex des racines primaires sont coupés pour permettre le développement des racines secondaires. Ces racines sont ensuite mises dans la solution de Hoagland pendant 4 jours (Ma et al., 1995 ; Knassmüller et al., 1998 ; AFNOR, 2003). Pour le témoin négatif, les racines sont immergées 30 h de plus dans la solution de Hoagland. Pour les essais, les racines sont immergées durant 6h dans la solution à tester puis pendant 24 h à nouveau dans la solution de Hoagland afin qu'elles puissent récupérer de la vitalité. Cinq concentrations d'effluents d'huileries d'olive traités sont utilisées (0.1%, 1%, 5%, 10% et 20%). Cinq répétitions sont effectuées pour chaque traitement. L'hydrazide maléique (40 µM) est utilisé pour le contrôle positif. Après exposition, les racines secondaires de *Vicia faba* sont coupées et placées dans des piluliers contenant la solution de Carnoy pendant 12 heures à 4°C. La solution de Carnoy est un fixateur qui permet de stopper les divisions cellulaires. Ensuite, les racines sont rincées 10 minutes dans de l'eau distillée, puis hydrolysées 6 minutes dans de l'acide chlorhydrique 1N porté à 60°C au bain-marie. Les racines sont ensuite placées dans un flacon contenant de l'orceine 1%, le tout est porté à 60°C pendant 2 à 3 minutes. L'orceine est un colorant qui a la propriété de colorer l'ADN. Les apex ainsi colorés sont disposés sur les lames de microscopie, puis écrasés au moyen d'une lamelle en verre. Les résultats sont exprimés en termes de nombre moyen de mitoses et de micronoyaux par 1000 cellules observées.

Le test statistique de Tukey (Keppel, 1973) est utilisé pour déterminer le seuil de signification des valeurs de chaque essai par rapport au contrôle négatif et positif.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Essai agronomique

Les rendements en matière sèche des plants de *Vicia faba* en fonction des apports en effluents d'huileries d'olive sont représentés dans la figure 1.

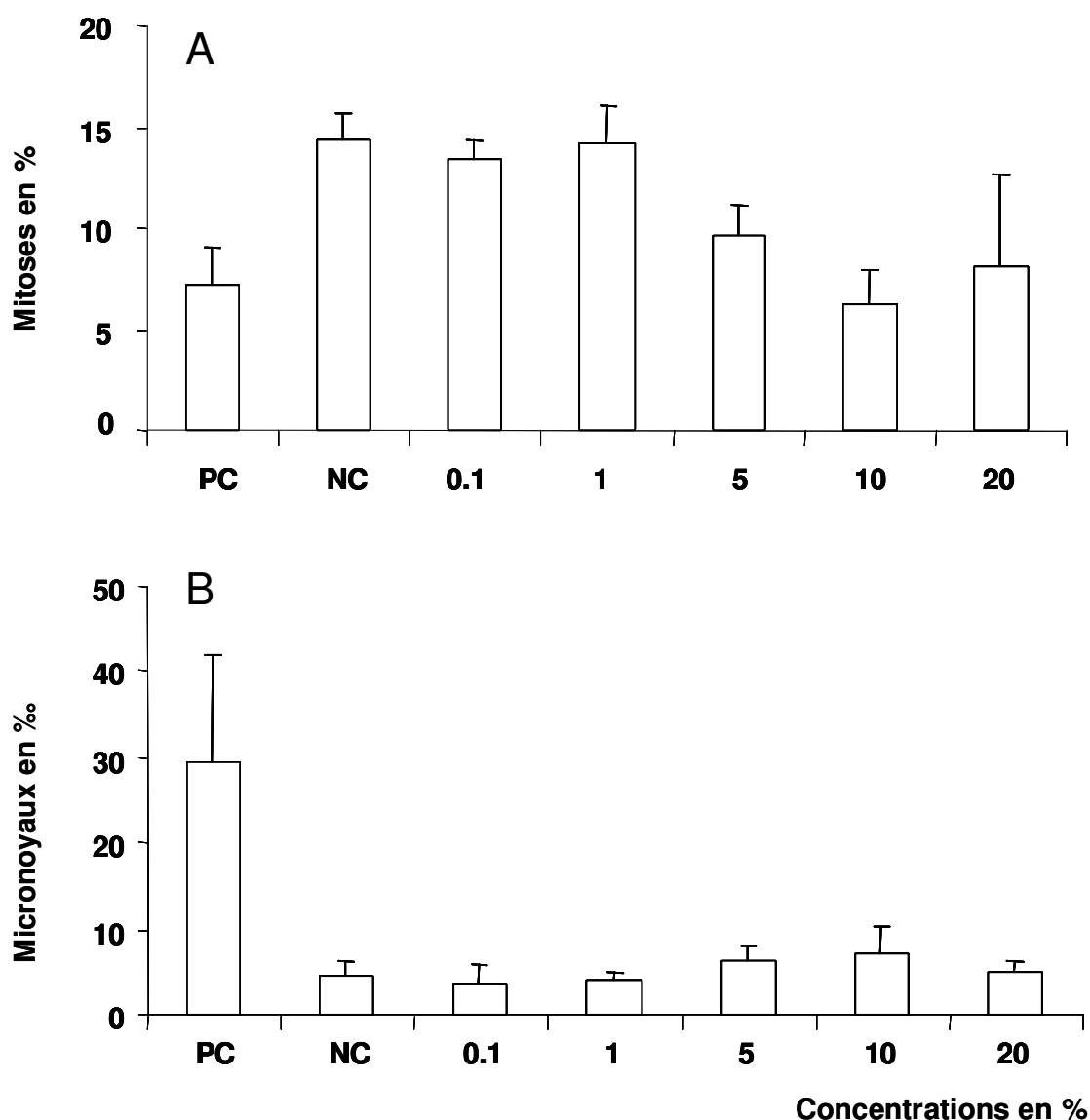


**Figure 1 :** Teneurs en matière sèche des plants de *Vicia faba* en fonction des apports de effluents d'huileries d'olive traités. MS : matière sèche.

La figure 1 montre que l'essai NPK donne des rendements en matière sèche qui sont significativement supérieurs aux rendements obtenus par le témoin et par la dose 20 t/ha. Les doses 5 t/ha et 10 t/ha ne sont pas significativement différentes de l'essai NPK. A l'exception de la dose 20 t/ha qui donne un rendement qui n'est pas significativement différent du témoin, les doses 5 t/ha et 10 t/ha donnent des rendements respectivement supérieurs de 36.33 % et de 29.90% par rapport au témoin. Ceci montre que les effluents d'huileries d'olive épandus à des doses de 5 et 10 t/ha sur le sol ne montrent aucun risque de phytotoxicité vis-à-vis des plants de *Vicia faba*. Aussi, ils ont un pouvoir fertilisant intéressant en raison de la teneur en matière organique et en macroéléments (potassium, azote et phosphore) (Di Giovacchino et al., 2002). En effet, l'obtention d'un produit final dans un état structurellement stable permet d'assurer au sol un meilleur amendement humifère sans risque.

### 3.2. Test de génotoxicité

Les résultats du comptage des cellules en divisions et des micronoyaux sur les cellules racinaires de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de effluents d'huileries d'olive traités sont représentés dans la figure 2.



**Figure 2.** Pourcentage de mitoses (A) et la fréquence des micronoyaux (B) dans les racines de *Vicia faba* exposées aux différentes concentrations d'effluents d'huileries d'olive traités (0.1% ; 1% ; 5% ; 10% et 20%).

PC : contrôle positif ; NC : contrôle négatif

La figure 2.A montre que la mise en contact des effluents d'huileries d'olive traités à 0.1 et à 1% avec les racines de *Vicia faba* n'a pas d'effet sur la division cellulaire par rapport au contrôle négatif, traduisant une absence d'effet sur la mitose des racines de *Vicia faba*.

A partir de 5%, il y a une diminution significative des mitoses ce qui met en évidence la cytotoxicité des effluents qui augmente avec la dose utilisée.

La composition de ces effluents étant mal connue, il est possible qu'à certaines concentrations se produisent des antagonismes entre les différents constituants des effluents.

Aussi, la cytotoxicité des effluents d'huileries d'olive peut être expliquée par la forte charge organique exprimée en demande chimique en oxygène qui reste toujours élevée après traitement.

L'exposition des cellules de *Vicia faba* à des concentrations croissantes d'effluents d'huileries d'olive traités (figure 2.B) montre que ces effluents n'entraînent pas une formation significative de micronoyaux par rapport au contrôle négatif même à une concentration de 20% alors qu'on a eu un effet génotoxique à une dilution de 10% avec les effluents d'huileries d'olive bruts (El Hajjouji et al., 2007).

Deux hypothèses sont alors possibles :

- Les effluents d'huileries d'olive ne sont plus génotoxiques pour les cellules de *Vicia faba* à cause de la disparition d'un ou de plusieurs composés génotoxiques au cours du traitement aérobie.
- La diminution drastique du nombre de mitoses, en diminuant fortement la division du noyau, ne permet pas d'obtenir les fragments du noyau.

La disparition des effets génotoxiques suite au traitement aérobie peut être plus facilement expliquée par la 1<sup>ère</sup> hypothèse du fait de la disparition des phénols totaux au cours du traitement, ces derniers passent de 0.46% au stade initial à 0.11% au stade final, ce qui correspond à un abattement de 75.85%. Cette réduction semble toucher principalement les deux composés phénoliques déjà révélés génotoxiques pour les plants de *Vicia faba*: l'oleuropeine et l'acide gallique (El Hajjouji et al., 2007).

#### 4. Conclusion

L'épandage des effluents d'huileries d'olive traités sur les sols agricoles constitue le moyen le plus économique pour résoudre le problème de l'écoulement de ce sous-produit, mais aussi le plus utile puisque les expériences réalisées ont montré le pouvoir fertilisant de ces effluents, qui peuvent être utilisés sur le sol pour remplacer partiellement ou totalement les fertilisants chimiques. Le test de génotoxicité révèle la disparition de la génotoxicité après le traitement aérobie des effluents d'huileries d'olive liée à la dégradation des composés phénoliques en particulier l'oleuropeine et l'acide gallique. Par conséquent, les effluents d'huileries d'olive traités peuvent être utilisés comme amendement organique sans aucun risque pour la plante s'ils sont suffisamment dilués.

De point de vue environnemental, l'épandage sur le terrain de ces déchets représente également une garantie écologique puisqu'il constitue la clôture d'un cycle naturel dans lequel l'intervention humaine est marginale.



## Références Bibliographiques

- AFNOR (2003). Qualité de l'eau-Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs- Evaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines de *Vicia faba*, AFNOR T95 EN 387, Saint-Denis.
- Cecchi M. (2003). Mise en évidence de biomarqueurs en écotoxicologie chez *Vicia faba*. Diplôme des Etudes Appliquées, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse 59 p.
- Chaminade R. (1960). Expérimentation en petits vases de végétation. Types d'essais pour tester l'efficacité des engrais humiques. Annales Agronomiques. 86-87, 121-126.
- Chenon P. (2001). Evaluation du pouvoir toxique, génotoxique et tératogène de boues de stations d'épuration. Thèse, Université Paul Sabatier de Toulouse 204 p.
- Cotelle S., Masferaud J.F., Rérard J.F. (1999). Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium / Vicia- micronucleus and the Tradescantia-micronucleus assays. Mutation Research. 426, 167-171.
- Di Giovacchino L., Basti C., Costantini N., Surricchio G., Ferrante D., Lombardi D. (2002). Effet de l'épandage des eaux de végétation des olives sur des sols complantés de maïs et de vigne. Olivae. 91, 37-43.
- Duan C.Q., Hu B., Jiang X.H., Wen C.H., Wang Z., Wang Y.X. (1999). Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. Mutation Research. 426, 121-125.
- El Hajjouji H., Pinelli E., Guiresse M., Merlina M., Revel J.C., Hafidi M. (2007). Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. Mutation Research. 634, 25-31.
- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli, A. Parrella A., Temussi F. (2003). Environmental Effects Caused by Olive Mill Wastewater: Toxicity Comparison of Low-Molecular-Weight Phenol Components. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51, 1005-1009.
- Keppel G. (1973). Design and analysis: a researcher's hand book, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 658.
- Knasmüller S., Gottmann E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., Göd R., Kundi M. (1998). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. Mutation Research. 420, 37-48.

- Ma T.H., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago E.V., Arreola G.A., Zhang H. (1995). The improved Allium / Vicia root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants, Mutation Research. 334,185-195.
- Minissi S., Lombi E. (1997). Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. Mutation Research. 393, 17-21.

## **SYNTHESE ET CONCLUSION GENERALE**

Traditionnellement, les producteurs artisanaux d'huile d'olive ont pour pratique soit le rejet direct des effluents d'huileries d'olive dans le milieu extérieur avec des effets néfastes sur les milieux, soit le rejet dans des bacs où il y a évaporation et développement de champignons de type moisissures. Après un temps de séjours allant, dans la région de Marrakech, jusqu'à la dessiccation totale, le déchet peut être utilisé sans risque en agriculture. Cette pratique empirique a été peu étudiée quant à ses fondements scientifiques. Ce travail a donc pour objectif : l'optimisation des conditions de traitement ; le suivi des transformations de la matière organique et surtout des lipides ; l'étude de la toxicité au cours du traitement avec l'identification des composés chimiques responsables de cette toxicité ; et enfin les effets sur les rendements des cultures une fois le déchet traité et transformé.

Ce traitement biologique est une filière de recyclage prometteuse qui peut fournir un produit de qualité réutilisable en agriculture et surtout de mise en œuvre très simple, pouvant être réalisé au niveau de la petite exploitation. La valeur fertilisante du produit est un critère important pour l'agriculteur. Ainsi, la qualité agronomique des effluents d'huileries d'olive a été étudiée par plusieurs chercheurs (Lombardo et al., 1993 ; Di Giovacchino, 2001). Ils ont montré que l'épandage de ces effluents, bruts ou traités sur les sols agricoles, a généralement des effets positifs sur la productivité des cultures, sur les caractéristiques du sol, et sur le nombre et la diversité des microorganismes présents dans le sol (Di Giovacchino, 2002) à cause de la richesse de ces déchets en matière organique et en sels minéraux notamment en potassium.

Pour améliorer le produit final et favoriser les transformations, on a fait varier les paramètres influençant l'efficacité du traitement. Les essais de traitement biologique des effluents d'huileries d'olive ont été réalisés selon la méthodologie de la recherche expérimentale. Les variables étudiées sont les conditions de pH, de température, d'aération et de rapport C/N.

L'évolution des caractéristiques physico-chimiques au cours de la première série de traitements (16 traitements) montre que :

- Le temps de séchage des effluents varie en fonction de la température.
- Le rapport C/N et les polyphénols diminuent au cours des 16 traitements, avec un abattement qui a atteint 94 % pour la 8<sup>ème</sup> expérience (pH initial=6 ; rapport C/N initial=59 ; température de 25°C ; avec aération).
- Le pH augmente d'avantage au cours des traitements réalisés à 25°C et à un rapport C/N ajusté par du nitrate d'ammonium à 30 en début d'expérience ;
- Dans les mêmes conditions, les polyphénols diminuent.

Les paramètres qui paraissent le plus influencer les résultats du traitement et qui sont les plus facilement modifiables sont le pH et le rapport C/N initial. Donc une étude plus fine de ces facteurs a été réalisée avec un nombre d'essais plus réduit (6 au lieu de 16).

Les résultats des analyses physico-chimiques montrent une augmentation du pH dans le cas des traitements à pH neutralisé. Il s'est produit également une réduction du rapport C/N et des polyphénols pour les six expériences, avec un abattement qui atteint 76% dans le cas du 4<sup>ème</sup> traitement (où le pH est neutralisé avec de la chaux et le rapport C/N modifié avec du nitrate d'ammonium).

On montre que :

- L'évolution du pH est influencée par sa valeur initiale et par le rapport C/N. Ainsi, l'ajustement du rapport C/N avec de l'urée et du pH avec de la soude permet une meilleure évolution de ce dernier qui au final est moins acide. Quant au rapport C/N, il diminue davantage lorsque le pH est ajusté avec de la soude. A un pH initial donné, quelle que soit la source d'azote ajoutée pour modifier le rapport C/N, l'évolution de ce dernier est la même. Ainsi, l'abattement des polyphénols dépend de deux facteurs : le pH et le rapport C/N initiaux.

Parmi les différents traitements biologiques réalisés dans ce travail, les deux traitements les plus efficaces ont été choisis pour illustrer et suivre l'évolution des différentes caractéristiques physico-chimiques. Les transformations de la matière organique sont suivies par différentes techniques : analyse élémentaire, spectroscopie IRTF et <sup>13</sup>C-RMN. De même, la fraction lipidique est suivie par chromatographie.

Les résultats des deux traitements biologiques (avec et sans chaux), après 45 jours, montrent que ces effluents ont un pH final de 5.39 et 5.69 (au lieu de 4.85 et 6.18 en début des traitements) respectivement pour les traitements 1 (sans chaux) et 2 (avec chaux).

Les traitements ont permis la réduction de la pollution avec des abattements de la DCO de 21.79 et 4.83% respectivement pour les traitements 1 et 2. Aussi, la neutralisation du pH par ajout de chaux montre un effet positif sur la dégradation des phénols, avec un abattement de 75.86% avec chaux contre 50.63% sans chaux.

Le traitement à la chaux a aussi changé la structure de la matière organique, ce qui est bien visible sur les spectres infrarouges.

Les résultats de l'analyse élémentaire, de la spectroscopie IRTF et  $^{13}\text{C}$ -RMN montrent qu'au cours du traitement 1, il y a une augmentation des composés aliphatiques et aromatiques et une diminution des fonctions carboxyliques. Par contre, au cours du traitement 2 à la chaux, les groupements aliphatiques diminuent (les molécules lipidiques et peptidiques) suite à leur utilisation comme source d'énergie par les populations microbiennes (Amir et al., 2004). En parallèle, les structures aromatiques sont substituées par des groupements phénoliques, méthoxyliques et carboxyliques, ces derniers diminuant en fonction du temps ce qui indique une condensation de la matière organique.

Le suivi des lipides au cours des deux traitements montre des variations quantitatives et qualitatives des différentes fractions lipidiques (lipides neutres, monoglycérides et phospholipides) qui varient en fonction du traitement choisi (avec ou sans chaux). Pour le traitement 1 (sans chaux), une augmentation des lipides totaux est observée tout au long de la période de traitement, celle-ci peut être associée à la phase exponentielle du développement de la communauté microbienne qui s'est mise en place au cours de ce traitement (Gill et al., 1977). Par contre, le traitement à la chaux montre une diminution des lipides totaux, ce qui correspond à une forte diminution des phospholipides qui sont sensibles à l'hydrolyse par la chaux, traduisant une lyse des micro-organismes initialement présents dans le milieu (Vestal et al., 1986, Nakasaki et al., 2004). Les produits de cette hydrolyse provoquent une augmentation des monoglycérides. Les lipides neutres, principalement composés de triglycérides, montrent la même évolution que les lipides totaux, c'est-à-dire une augmentation pour le traitement 1 et une diminution pour le traitement 2 en relation avec le développement microbien observé.

La spectroscopie  $^{13}\text{C}$ -RMN effectuée sur les échantillons initiaux et finaux avant et après traitement au solvant (chloroforme/méthanol) a permis de confirmer les variations observées entre les fractions de lipides obtenues par chromatographie et de montrer la similitude entre le traitement de ces effluents à la chaux et au solvant. Elle a permis aussi la mise en évidence de deux zones spectrales intéressantes : C O-alkyl et C-carboxylique qui permettent de compléter l'évolution des lipides par des mécanismes mettant en jeu des structures polysaccharidiques.

Le traitement chimique par photocatalyse peut être une méthode alternative. Il a été utilisé par plusieurs chercheurs pour la dégradation de la lignine (Kobayakawa et al., 1989 ; Tanaka et al., 1999 ; Chang et al., 2004) et pour le traitement des eaux usées (Ollis and Al Ekabi, 1993 ; Dillert et al., 1998) et des eaux contaminées par des molécules organiques (Hoffmann et al., 1995; Ollis and Al Ekabi, 1993; Pelizzetti et al., 1994; Selli et al., 1999). La photocatalyse

consiste à irradier, naturellement par le soleil ou artificiellement par une lampe, un semi-conducteur, ce qui permet de minéraliser la matière organique. Le dioxyde de titane reste néanmoins le plus actif et le plus approprié pour l'application environnementale.

Les résultats du traitement par photocatalyse montrent une réduction du pouvoir polluant des effluents d'huileries d'olive. Les abattements après 24 heures de traitement sont de 22.22%, 57% et 94.34% respectivement pour la demande chimique en oxygène, la coloration (UV à 330 nm) et les phénols. L'application de la méthode des Fictitious Atomic-Group Separation (FAS) (Tardy et al., 2005) montre l'augmentation du niveau d'oxydation du carbone et indique que l'attaque porte d'abord et plus fortement sur les structures aromatiques. La spectroscopie UV-visible et IRTF confirme ces résultats et montre qu'il y a évidemment une attaque prioritaire des parties aromatiques des macromolécules non dialysantes, accompagnée d'une attaque nettement moindre des parties hydroxylées.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la toxicité et de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive à l'aide du test des micronoyaux. Ce test a été utilisé par plusieurs auteurs pour l'évaluation de la génotoxicité de différentes matrices y compris l'eau (Duan et al., 1999), le sol (Cotelle et al., 1999 ; Knasmüller et al., 1998), les eaux usées et les déchets industriels (Thangapandian et al., 1995). Cependant, aucune étude n'a été menée pour tester la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive par cette méthode. Ce test est basé sur la détection de micronoyaux dans les cellules des extrémités radiculaires de *Vicia faba* exposées en hydroponie aux substances testées (effluents d'huileries d'olive et phénols).

Les résultats de l'essai montrent que les effluents dilués à 10% induisent une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux dans les cellules de racines de *Vicia faba* par rapport au témoin négatif. L'exposition des plants de *Vicia faba* aux six composés phénoliques déterminés par HPLC dans ces effluents a montré que la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive est due à deux composés phénoliques : l'oleuropeine et de l'acide gallique. Elle est liée principalement à la structure des molécules des deux composés et selon les conditions expérimentales, elle peut être associée à la formation de  $H_2O_2$  dans les cellules de la culture testée.

Dans le but de confirmer l'absence d'une éventuelle toxicité des effluents d'huileries d'olive après traitement, un test toxicologique utilisant *Vicia faba* comme plante de référence est

réalisé en vases de végétation. Les résultats obtenus montrent que les doses 5 t/ha et 10 t/ha donnent des rendements en matière sèche aérienne respectivement supérieurs de 36.33% et de 29.90% par rapport au témoin. Ce qui montre que les effluents d'huileries d'olive épandus à des doses de 5 et 10 t/ha sur le sol ne montrent aucun risque de phytotoxicité vis-à-vis de *Vicia faba*. Ils ont même un pouvoir fertilisant intéressant en raison de la matière organique et des macroéléments, potassium, azote et phosphore qu'ils contiennent (Di Giovacchino et al., 2002).

Le test de génotoxicité a confirmé ces résultats et il a montré la disparition de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive traités et dilués à 20%. Cette disparition peut être expliquée par la disparition des phénols totaux. Cette réduction semble toucher principalement les deux composés phénoliques déjà révélés génotoxiques pour les plants de *Vicia faba*: l'oleuropeine et l'acide gallique (El Hajjouji et al., 2007).

Les effluents d'huileries d'olive montrent alors un effet positif sur la culture de *Vicia faba* et ne présentent aucun risque de toxicité ni de génotoxicité pour la plante après traitement. Aussi, ils présentent une valeur agronomique similaire à une fertilisation classique avec les engrais.

A la lumière de ces résultats, le traitement aérobie des effluents d'huileries d'olive a donné des résultats intéressants. Il a permis la réduction de la pollution de ce produit. La caractérisation structurale de ces effluents à différents stades du traitement est effectuée en utilisant un ensemble de techniques diverses et complémentaires telles que l'analyse élémentaire et les techniques spectroscopiques. Le choix d'une méthode pratique pour la détermination du degré d'aromaticité des effluents d'huileries d'olive amène à considérer à la fois la simplicité de la technique, sa reproductibilité, et l'acquisition des données relativement quantitatives sur la distribution du carbone entre les différentes structures chimiques. L'infrarouge est certes une méthode simple et accessible, mais reste très limitée pour déterminer le degré d'aromaticité des structures chimiques puisque des structures aromatiques et aliphatiques peuvent absorber dans une même zone du spectre IR. Comme l'avait montré Ouatmane (2000), la spectroscopie  $^{13}\text{C}$ -RMN est une technique qui permet de suivre l'importance relative des différentes formes du carbone et qui fournit le plus de données quantitatives sur le degré d'aromatisation du produit analysé. Contrairement à ce que disait Ouatmane (2000), cette technique ne peut être retenue tant pour les petits producteurs que pour les industries du fait des coûts analytiques et la très haute technicité nécessaire au maniement des outils.



Le traitement biologique des effluents peut être assimilé à un processus de dépollution ou de détoxification des polluants organiques à condition de bien contrôler les différentes conditions pour le développement d'une grande variété de populations microbiennes permettant des séquences métaboliques et enzymatiques variées, suffisamment efficaces pour dégrader le déchet. Ainsi, le traitement biologique des effluents d'huileries d'olive permet de résoudre un problème environnemental et le produit final peut être valorisé en agriculture en tant qu'amendement organique, non toxique et peu onéreux, sur les sols marocains qui sont généralement pauvres en matière organique.

La chaux favorise le traitement biologique des effluents d'huileries d'olive, elle permet d'une part, d'augmenter le pH ce qui rend le milieu plus favorable au développement bactérien, d'autre part elle permet un changement de la structure de la matière organique et la dégradation de quelques composés présents dans les effluents d'huileries d'olive, en particuliers les lipides.

En comparaison avec le traitement biologique, le traitement chimique des effluents d'huileries d'olive est très rapide (24 heures au lieu de 45 jours). Il permet la réduction de la pollution de ces effluents en termes de phénols et de DCO et il permet une réduction importante de la couleur des effluents, responsable en partie de l'effet polluant des déchets. Par contre, il présente l'inconvénient d'être chère et inaccessible à la plupart des propriétaires de moulins.

Le test des micronoyaux a permis la mise en évidence de la génotoxicité des effluents d'huileries d'olive sur les plantes de *Vicia faba* et a permis de trouver les deux composés phénoliques, l'oleuropeine et l'acide gallique, responsables de cet effet. Il a aussi révélé l'absence de génotoxicité des effluents d'huileries d'olive traités par aérobiose et dilués à 20%. Le test agronomique a confirmé ces résultats et a montré que les effluents traités ne présentent aucun risque de toxicité pour les plants de *Vicia faba*.

Finalement, les données acquises dans ce travail ne doivent pas rester limitées à un cadre de recherche universitaire. La résolution des problèmes liés aux déchets d'huileries d'olive ne pourrait réussir sans un transfert d'information à l'extérieur pour sensibiliser le public aux problèmes de pollution que peuvent engendrer ces déchets pour notre environnement.

## Références Bibliographiques

- Amir S., Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Revel J.C. (2000). Elemental analysis, FTIR and  $^{13}\text{C}$ -NMR of humic acids from sewage sludge composting. *Agronomie*. 24, 13-18.
- Chang C.N., Ma Y.S., Fang G.C., Chao A.C., Tsai M.C., Sung H.F. (2004). Decolorizing of lignin wastewater using the photochemical UV/TiO<sub>2</sub> process. *Chemosphere*. 56, 1011-1017.
- Cotelle S., Masferaud J.F., Rérard J.F. (1999). Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium / Vicia- micronucleus and the Tradescantia-micronucleus assays. *Mutation Research*. 426, 167-171.
- Di Giovacchino L., Basti C., Costantini N., Ferrante M.L., Surricchio G. (2001). Effects of olive vegetable water spreading in the soil cultivated with maize and grapevine. *Agricoltura Mediterranea*. 131, 33-41.
- Di Giovacchino L., Basti C., Costantini N., Surricchio G., Ferrante D., Lombardi D. (2002). Effet de l'épandage des eaux de végétation des olives sur des sols complantés de maïs et de vigne. *Olivae*. 91, 37-43.
- Dillert R., Siemon U., Bahnemann D. (1998). Photocatalytic Disinfection of Municipal Wastewater. *Chemical Engineering and Technology*. 21, 356-358.
- Duan C.Q., Hu B., Jiang X.H., Wen C.H., Wang Z., Wang Y.X. (1999). Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutation Research*. 426, 121-125.
- El Hajjouji H., Pinelli E., Guiresse M., Merlina M., Revel J.C., Hafidi M. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutation Research* (in press).
- Gill C.O, Hall M.J, Ratledge C. (1977). Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Applied Environmental Microbiology*. 33, 231-239.
- Hoffmann M.R., Martin S.T., Choi W., Bahnemann D.W. (1995). Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chemical Reviews*. 95, 69-96.
- Knasmüller S., Gottmann E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., Göd R., Kundi M. (1998). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research*. 420, 37-48.

- Kobayakawa K., Sato Y., Nakamura S., Fujishima A. (1989). Bull. Photodecomposition of Kraft Lignin Catalyzed by Titanium Dioxide. Chemical Society of Japan. 62, 3433-3436.
- Lombardo N., Briccoli-Bati C., Marsilio V., Di Giovacchino L. (1993). Comportamento vegeto-produttivo di un oliveto trattato con acque di vegetazione. Atti del Convegno. Tecniche, norme e qualità in Olivicoltura. Potenza. I, 97-107.
- Nakasaki K. (2004). Degradation of fats during thermophilic composting of organic waste. Waste Management and Research. 22:276-282.
- Ouatmane A. (2000). Etude du compostage de quelques déchets organiques: I- Approche physico-chimique, calorimétriques et spectroscopiques de l'étude de l'état de maturation des composts. II- Analyse qualitative et quantitative de la fraction humique. Marrakech: Faculté de Sciences Semlalia; Ph.D. thesis. p.170.
- Ollis D.F., Al Ekabi H. (1993). Photocatalytic purification and treatment of water and air, Elsevier.
- Pelizzeti E., Minero C., Vicente M. (1994). Photocatalytic degradation of organic contaminants. In Technology for Environmental Cleanup: Toxic and Hazardous Waste Management, eds. A. Avogadro and R.C. Ragaini, pp. 101-138. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. Process Biochemistry. 35, 725-735.
- Selli E., Baglio D., Montanarella L., Bidoglio G. (1999). Role of humic acids in the TiO<sub>2</sub>-photocatalyzed degradation of tetrachloroethene in water. Water Research. 33, 1827-1836.
- Tanaka K., Calanag R.C.R., Hisanaga T. (1999). Photocatalyzed degradation of lignin on TiO<sub>2</sub>. Journal of Molecular Catalysis. 138, 287-294.
- Tardy Y., de Toledo M.C.M., Bailly J.R., Guisresse M., Revel J.C. (2005). Towards the thermodynamic treatment of humic substances in soils. Revista do Instituto Geológico, São Paulo. 26(1/2), 45-51.
- Thangapandian V., Sophia M., Swaminathan K. (1995). Cytological effect of tannery effluents on root meristems of *Allium cepa* Linn test system. Journal of Environmental Biology. 16, 67-70.
- Vestal J.R., McKinley V.L. (1986). Microbial activity in composting municipal sewage sludge. Research and Development. USEPA, Cincinnati, OH.

## **Perspectives**

- L'optimisation de traitement biologique des effluents d'huileries d'olive pourra s'orienter vers la sélection et l'utilisation de souches de microorganismes les plus performantes pour la valorisation de ces déchets.
- Réaliser les essais biologiques et chimiques à grande échelle.
- Faire une étude économique sur le coût de chaque traitement.

## **ANNEXES**

## Matériel et méthodes (complément)

### 1. pH

Le pH est mesuré dans une suspension d'effluents d'huileries d'olive à température ambiante. La technique utilisée est la méthode électrométrique préconisée par Rodier (1971). La mesure du pH se fait directement dans les effluents d'huileries d'olive bruts à température ambiante. Elle renseigne sur la concentration en ions  $H^+$  libres dans la solution, elle est réalisée à l'aide d'un pH-mètre après standardisation à l'aide de solutions tampons (pH 4 et pH 7).

### 2. Conductivité électrique

La conductivité électrique est mesurée dans les effluents d'huileries d'olive bruts à température ambiante. Elle est exprimée en siemens par centimètre (S/cm). La méthode utilisée est celle décrite par Rodier (1971). La conductivité d'une solution aqueuse est la conductance d'une colonne d'eau comprise entre deux électrodes métalliques de  $1\text{ cm}^2$  de surface et séparées l'une de l'autre de 1 cm. Elle mesure l'aptitude de conduire les charges d'électrons dans une solution liquide.

### 3. Matière sèche

10 ml d'effluents d'huileries d'olive sont mis dans un creuset en porcelaine préalablement séché et taré, il est gardé à l'étuve à  $105^\circ\text{C}$  jusqu'à poids constant. La teneur en matière sèche, exprimée en g/l, est donnée par la formule suivante :

$$MS = (M_1 - M_2) \times 1000/V$$

MS: matière sèche en g/l.

$M_1$ : masse du creuset avec matière sèche en g/l.

$M_2$  : poids du creuset vide en g.

V : volume de la prise d'essai en ml.

### 4. Taux de cendres

La matière sèche obtenue est calcinée à  $550^\circ\text{C}$  dans un four à moufle pendant une nuit. La teneur en cendres exprimée en g/l est donnée par la formule suivante :

$$Cd = (M_3 - M_2) \times 1000/V$$

Cd : cendres en g/l.

$M_2$  : poids du creuset vide en g.

$M_3$  : poids du creuset avec cendres en g.

V : volume de la prise d'essai en ml.

### 5. Demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) est la quantité d'oxygène consommée par les matières existantes dans l'eau et oxydables dans des conditions opératoires définies. La méthode utilisée est celle décrite par Rodier (1984).

25 ml d'effluents d'huileries d'olive dilués 1000 fois sont introduits dans un ballon de 250 ml, additionnés de 0.5 g de sulfate de mercure cristallisé et 2.5 ml de solution sulfurique de sulfate d'argent. Le mélange est chauffé jusqu'à la dissolution totale. Par la suite 12.5 ml de la solution de bichromate de potassium (0.25 N) et 35 ml de la solution sulfurique de sulfate d'argent sont ajoutés, le tout est porté à ébullition sous réfrigérant à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, le ballon est complété à 250 ml par l'eau distillée, plus quelques gouttes de solution de ferroïne.

L'excès de bichromate est titré avec la solution de sulfate de fer et d'ammonium (0.25 N) jusqu'à obtenir une coloration rouge violacée. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions opératoires sur 25 ml d'eau distillée.

La DCO en gramme d'oxygène par litre d'effluents d'huileries d'olive est donnée par la formule suivante :

$$\text{DCO (g/L)} = \frac{8 \times (V_1 - V_2) \times T}{V} \times F$$

$V_1$ : volume en ml de sulfate de fer et d'ammonium nécessaire au dosage.

$V_2$  : volume en ml de sulfate de fer et d'ammonium nécessaire à l'essai à blanc.

T : la normalité de la solution de sulfate de fer et d'ammonium.

V : volume en ml de la prise d'essai.

F : facteur de dilution.

### 6. Carbone organique total (COT)

Le carbone organique est oxydé par un oxydant puissant : le bichromate de potassium en milieu sulfurique, à froid. L'excès de bichromate est titré par une solution de sulfate de fer et d'ammonium (sel de Mohr) (Aubert, 1978).

Dans un erlen de 250 ml, sont introduits 25 mg d'effluents d'huileries d'olive (séchées à l'étuve à 105°C), additionnés de 10 ml de bicarbonate de potassium (1N) et 25 ml d'acide sulfurique concentré, agiter une minute et laisser reposer 30 min sur une plaque de bois. La réaction est stoppée par ajout de 100 ml d'eau distillée. Après 2 heures de décantation, à 25 ml de la solution sont ajoutés 5 ml de l'acide orthophosphorique et 3 gouttes de diphénylamine. Après agitation, l'excès de bichromate est titré par une solution de sulfate de fer et d'ammonium N/2 jusqu'au virage vert. Un blanc est réalisé dans les mêmes conditions.

Le carbone organique total exprimé en pourcentage de matière sèche est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ COT} = \frac{(\text{Ve} - \text{Vt}) \times \text{F}}{\text{P Vt}}$$

COT : carbone organique total en pourcentage de matière sèche.

Vt : volume de titre de témoin en ml.

Ve : volume de titre de l'échantillon en ml.

F : facteur de correction: 3.9.

P : poids de la prise d'essai en mg.

## 7. Azote Kjeldahl (NTK)

L'azote des composés organiques est transformé en azote ammoniacal sous l'action de l'acide sulfurique concentré qui, porté à ébullition, se comporte comme oxydant et fixe l'ammoniaque donnant le sulfate d'ammonium (Méthode Kjeldahl). Lorsque la matière organique est totalement oxydée, on procède au dosage de l'azote ammoniacal par distillation après neutralisation de l'acide sulfurique (Ezelin, 1998). L'ammoniac dégagé est recueilli dans une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N/10 et le dosage s'effectue en retour en présence d'indicateur de Tashiro.

Dans un matras de Kjeldahl, sont mis 10 ml d'effluents d'huileries d'olive, ajouter 10 ml de l'acide sulfurique concentré, 2.2 g du catalyseur au sélénium et 5 g de sulfate de sodium pour augmenter la température d'ébullition. Le tout est mis à bouillir jusqu'à obtention d'une liquide jaune paille. Une fraction aliquote est transvasé dans un ballon et mis dans un distillateur et on ajoute de la lessive de soude. On distille et le distillat est récupéré dans 20



ml d'eau distillée pour distillation (Distillateur type "BUCHI"). Le distillat est titré avec l'acide sulfurique (0.05N) en présence d'indicateur de Tashiro. Un blanc est fait dans les mêmes conditions.

L'Azote total Kjeldahl (NTK) exprimé en mg/l est donné par la formule suivante :

$$\text{NTK (mg/l)} = \frac{N (\text{Ve} - \text{Vt}) \times 14 \times 1000}{V}$$

Ve : volume de titre de l'échantillon.

Vt : volume de titre de témoin.

N : normalité de l'acide sulfurique.

V : volume en ml de la prise d'essai.

## 8. Extraction et dosage des composés phénoliques

### Extraction des composés phénoliques

La technique d'extraction des composés phénoliques utilisée est celle élaborée par (Macheix et al., 1990). A 5 ml d'effluents d'huileries d'olive préalablement filtrés sur papier filtre, nous ajoutons une solution de sulfate d'ammonium 40 % (v/v) pour augmenter la force ionique du milieu, et une solution d'acide métaphosphorique 20 % (1/10 v/v) pour empêcher l'oxydation des composés phénoliques. Nous procédons par la suite à une délipidation et une dépigmentation par l'éther de pétrole (1/2 v/v) 3 fois. Puis la délipidation se poursuit par une extraction 3 fois par l'acétate d'éthyle (v/v), l'extrait est évaporé à sec à 35°C et le résidu est récupéré dans 5 ml du méthanol pur.

### Dosage des composés phénoliques

Le dosage des phénols totaux a été effectué par le réactif de Folin-Ciocalteu (Vasquez et al., 1974). Ce réactif contenant du phosphomolybdate et du tungstate de sodium, oxyde les polyphénols et se réduit en oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

50 µl de l'extrait phénolique sont placés dans un tube à essai, auxquels nous ajoutons 1.35 ml d'eau distillée et 200 µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes, 400 µl d'une solution de carbonate de sodium à 20 % sont ajoutés, les tubes sont agités puis incubés à 40°C

pendant 30 minutes. L'absorbance de la solution bleue est mesurée par la suite au spectrophotomètre à 760 nm.

Les teneurs en composés phénoliques sont exprimées en g/l par référence à une gamme étalon à base d'acide caféique préparé à 60 mg / 100 ml dans le méthanol 36%.

### Préparations des réactifs (test des micronoyaux)

#### 1. Solution de Carnoy

Elle est composée d'acide acétique glacial et d'éthanol dans des proportions respectives de 25% et 75%.

#### 2. Hydrazide maléique

Peser 11.2 mg d'acide hydrazine maléique dans 100 ml d'eau distillée. Agiter 1 heure à l'abri de la lumière.

#### 3. Orcéine

L'orcéine 1% est dilué dans l'acide acétique 45%. Le mélange est porté à ébullition pendant 10 minutes, puis filtré après refroidissement.

#### 4. Milieu de Hoagland (AFNOR, 2003)

| Produit  | Solution mère | Quantité de la solution<br>mère /l du milieu | Concentration<br>finale |
|--|---------------|--|-------------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                     | 50.5 g/l      | 10 ml  | 5 mM                    |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O | 118.0 g/l     | 10 ml  | 5 mM                    |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 123.2 g/l     | 10 ml  | 5 mM                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 13.6 g/l      | 10 ml  | 1 mM                    |
| Tartrate de Fer                                      | 500 mg/l      | 10 ml  | 9 µM                    |

**Références Bibliographiques**

- AFNOR. (2003). Qualité de l'eau- Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs- Evaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines de *Vicia faba*, AFNOR T95 EN 387, Saint-Denis.
- Aubert G. (1978). Méthodes d'analyses des sols. Edition C.R.D.P. Marseille. p. 360.
- Ezelin De Souza K. (1998). Contribution à la valorisation de la bagasse par transformation biologique et chimique. Valeur agronomique des composts et propriétés suppressives vis-vis du champignon phytopathogène *Fusarium solanum*. Thèse de troisième cycle. Institut national polytechnique de Toulouse. 386 p.
- Macheix J.J., Fleuriet X.X., Billot J.A. (1990). Fruit phenolics. CRC press Inc, Boca Raton Florida. 378 p.
- Rodier J. (1971). L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau. Ed-DUNOD, Paris.
- Rodier J. (1984). L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 7ème édition, Dumond, Paris.
- Vasquez Roncero R.A., Graciani Constante C.E., Maestroduran D.R. (1974). Componentes fenolicos de la aceituna. I- polifenoles de la pulpa. Grasas y Aceites. 25, 269-279.